

IMMUNHISTOCHEMISCHE DARSTELLUNG
VON GLIA-ASSOZIIERTEN ANTIGENEN
BEI ASTROCYTOMEN UND GLIOBLASTOMEN
SOWIE DEN DARAUS ETABLIERTEN KULTUREN

BARBARA STOCHDORPH

Disbui. München

1987

Aus dem Institut für Tierpathologie der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Aus dem Institut für Pathologie
Abteilung für klinische und experimentelle Neuroonkologie
Städtisches Krankenhaus Bogenhausen
Akademisches Lehrkrankenhaus
der Technischen Universität München

Aus dem Institut für Neuropathologie der
Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

**Immunhistochemische Darstellung von glia-assoziierten
Antigenen bei Astrocytomen und Glioblastomen
sowie den daraus etablierten Kulturen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Barbara Stochdorph
aus Düsseldorf

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Korreferent: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht	9
2.1.	Immunhistochemie	9
2.2.	Spezifische Proteine als Antigene	12
2.2.1.	Saures Gliafaserprotein	12
2.2.2.	S-100-Protein	16
2.3.	Zellkulturen	18
3.	Problemstellung	23
4.	Material und Methodik	25
5.	Ergebnisse	28
5.1.	Auflistung	29
5.2.	Auswertung	30
5.2.1.	Histologische Präparate	30
5.2.1.1.	Astrocytome WHO-Grad II	30
5.2.1.2.	Astrocytome WHO-Grad III	33
5.2.1.3.	Glioblastome	33
5.2.2.	Zellkulturen	35
6.	Diskussion	41
6.1.	GFAP-Reaktion	41
6.2.	S-100-Reaktion	47
7.	Zusammenfassung	49
8.	Summary	50
9.	Literatur	52

Anhang Tabelle 1

1. Einleitung

Der Begriff des "Astrocyten" entstand Ende des letzten Jahrhunderts, nachdem der 1862 von Virchow beschriebene "Nervenkitt" mit Hilfe der Gliafaser-Färbung nach Weigert und der Silberinkrustierungs-Methode nach Golgi genauer untersucht werden konnte (74). Die Bestandteile des als Stützgewebe erscheinenden Gliafaserverbandes, "Kurz- und Langstrahler" nach v. Kölliker, wurden wegen ihres sternförmigen Aussehens als Astrocyten bezeichnet.

Oligodendrocyten als eine weitere Gliatform wurden erst 1921 von Hortega mittels einer Silberkarbonatmethode dargestellt, nachdem lange Zeit das "dritte Element" nach Cajal - neben Nervenzellen und Astrocyten - nicht näher aufgeschlüsselt werden konnte.

Schon 1893 wurden von v. Kölliker und Andriezen zwei verschiedene Erscheinungsformen von Astrocyten erkannt, die sie protoplasmatisch und fibrillär nannten (47). Mit der Goldsublimatmethode von Cajal konnten vor allem die fibrillären Astrocyten der weißen Substanz untersucht werden, für die relativ kleine Zelleiber und längere, dicke Fortsätze charakteristisch sind (21). Das Hauptmerkmal, die in den Fortsätzen parallel zu den Längsachsen verlaufenden Fibrillenbündel, erscheinen mit dieser Methode allerdings nur als dunkle Verfärbung. Die protoplasmatischen Astrocyten der grauen Substanz, deren Kerne weniger stark eingebuchtet sind und die unregelmäßigere Umrisse zeigen, weisen stärker verzweigte, dünnere Fortsätze ohne wesentliche Fibrillenbündel auf.

Zwischenformen zwischen protoplasmatischen und fibrillären Astrocyten werden von Duffy (21) darauf zurückgeführt, daß sich protoplasmatische in fibrilläre Formen verändern. Eine solche Umwandlung bei pathologischen Prozessen wird auch von Ostertag (59) angegeben.

Luse (47) bezeichnet ganz allgemein den reaktiven Astro-

cyten als fibrillär, unabhängig von seiner vorherigen Morphologie. Eine besondere Form des fibrillären Astrocyten ist durch die oft parallel angeordneten Kerne und Fortsätze bei der isomorphen Gliose gekennzeichnet; für sie hat Penfield (61) den Ausdruck "piloide" Astrocyten eingeführt.

Große, homogen erscheinende Astrocyten, deren Zellkerne exzentrisch in den meist ovalen Zellkörpern liegen und die schon früh Fibrillen entwickeln, sind eine weitere Reaktionsform, die besonders bei umschriebenen Prozessen beobachtet wird. Nissl nannte diese Zellen "plumpe" oder "gemästete" Astrocyten (61), heute bezeichnet man sie meist als Gemistocyten (gemistos (griech.) = gemästet sein). Penfield (61) nahm an, daß aus Nissl's "gemästeten" Astrocyten jene mehrkernigen Zellen entstehen, die im Verhältnis zu normaler Glia übergroße Ausmaße annehmen können und daher Riesen-Astrocyten genannt werden. Sie treten vor allem bei chronischen Prozessen auf.

Die Entdeckung der Gliiformen zog Überlegungen über ihre Genese nach sich. Nach Ansicht von Penfield (61) entwickelt sich der Astrocyt aus verschiedenen Formen eines "Spongioblasten", der über die Zwischenstufen eines "primitiven Spongioblasten" aus dem "Neuroepithel" entsteht, wobei sich eine dieser Formen auch zum Oligodendrocyten differenzieren kann. Bei dieser Theorie einer gemeinsamen Stammzelle von Astro- und Oligodendroglia, die auch Ostertag 1941 (59) vertrat, wurde von Bailey und Cushing die Gliogenese der Oligodendroglia auf einen hypothetischen "Medulloblasten" zurückgeführt (57).

Niessing verglich 1980 (57) die bis dahin aufgestellten Gliogeneseschemata und gelangte zu dem Schluß, "daß die sichere Basis der Befunde weitgehend im Interesse einer Hypothesenbildung verlassen wurde."

In letzter Zeit wird bei der Betrachtung der Gliogenese der Nachdruck nicht mehr auf scheinbar genau zu unterscheidende Zellformen gelegt, sondern die Topographie der Diffe-

renzierungsstufen berücksichtigt.

So beschreibt Duffy (21), daß die Zone der mitotischen Aktivität zunächst in der Ventrikelwand liegt und später in eine subventrikuläre Schicht rückt, aus der sich die meisten Neuronen, Astrocyten und Oligodendrocyten herleiten.

Gliazellen und Neuronen unterscheiden sich auch in der fortgesetzten Teilungsfähigkeit der Gliazellen, sowohl in der folgenden prae- und postnatalen Entwicklung, als auch unter abnormalen Bedingungen.

Auf Beobachtungen bei Zellkulturen stützt Fedoroff (25) seine Theorie, daß Zelllinien mit kontinuierlicher Abfolge von unreifen Zellen, Glioblasten, Proastroblasten und Astroblasten während der Embryogenese und postnatal zur Astrocytendifferenzierung führen. Die Oligodendroglia-Linie ist im Gegensatz zur astrocytären diskontinuierlich und biphasisch, wobei aber die Zelllinien des Nervengewebes in ihrer Entwicklung wechselseitig abhängig sind.

Zwar konnte nachgewiesen werden, daß die Differenzierungsrichtungen der Zellen des ZNS in den frühen Stadien der Neuralrohrbildung festgelegt werden, Stammzellen für die verschiedenen Zellen des ZNS sind aber bisher nicht bestimmbar. Ebenso wenig ist der genaue Zeitpunkt bekannt, zu dem die Zellen des ZNS in neuronale oder gliale Vorläuferzellen geschieden werden (25).

Der Ansicht völlig getrennter Entwicklungslinien der Astro- und Oligodendroglia stehen auch Überlegungen von Niessing (57) entgegen, nach denen er bivalente Teilungen eines Astroblasten in dem Sinn für möglich hält, daß als Tochterzellen ein Astroblast und ein Oligodendroblast entstehen können.

Für Penfield (61) stellte sich sogar die Frage, ob sich ein ausdifferenzierter Oligodendrocyt unter bestimmten Bedingungen in einen Astrocyten umwandeln kann. Obwohl er Anhaltspunkte für diese Theorie gefunden zu haben glaubte, mußte er die Frage offen lassen.



Temple und Raff (76) zeigen an Hand von Beobachtungen bei der Entwicklung der bipotenten Gliavorläuferzelle im Nervus opticus der Ratte, daß sich diese Vorläuferzelle unter unterschiedlichen äußeren Bedingungen entweder zu einem Typ-2-Astrocyten oder einem Oligodendrocyten differenzieren kann.

Der Erforschung des Gliagewebes und seiner Genese folgten später Untersuchungen von Neubildungen des Gehirns, wobei für die biologische Tumorerwertigkeit weniger die histologische Zuordnung des Tumorgewebes, als vielmehr die sich daraus ergebenden Schlüsse auf den klinischen Verlauf interessant waren.

Bailey und Cushing veröffentlichten 1926 eine der ersten allgemein angewandten Klassifikationen, die auf einem embryogenetischen Einteilungsprinzip beruht. Ihrer Ansicht nach ist das Differenzierungsdefizit der Zellen rasch wachsender Tumoren nicht als Verlust von Differenzierungspotenz aufzufassen (74), sondern als Ausdruck dessen, daß die hypothetische Urgeschwulstzelle auf einer niedrigen Differenzierungsstufe gleichsam stehengeblieben ist - auf der auch die nachfolgenden Tumorzellgenerationen stehenbleiben -, so daß die Tumoren nach der wirklichen oder hypothetischen Embryonalzelle benannt werden können, der die vorherrschende Tumorzellart am ähnlichsten ist. Dementsprechend umfaßt diese Klassifikation das multiforme Glioblastom (ursprünglich multiformes Spongioblastom), das polare Spongioblastom, das Astroblastom und das fibrilläre und protoplasmatische Astrocytom als Tumoren der astrocytären Reihe (9).

Kernohan et al. (9, 41) kamen aufgrund von klinischen Beobachtungen zu dem Schluß, daß das Glioblastom als ein maximal entdifferenziertes Astrocytom, Oligodendrogliom oder Ependymom anzusehen ist, und eliminierten deshalb diesen Begriff. Nach ihrer Klassifizierung der hirneigenen Tumoren werden die Gliome, gemäß den Hauptgruppen von Bailey und Cushing, in vier Malignitätsgrade eingeteilt, wobei Anapla-

sie und Anzahl von Mitosefiguren ausschlaggebend sind.

Statt dieser Unterteilung in vier Grade wurden von Henschen (34, 35) nur drei verwendet. In seiner Einteilung wurde der Begriff des Glioblastoms für die maximal entdifferenzierten Varianten verschiedener Gliiformen verwandt, nicht als selbständige, primäre Tumorform wie von Bailey und Cushing.

Der klinisch orientierten Klassifikation von Kernohan et al. schlossen sich weitere Autoren wie Ackerman und Rosai (1), Burger und Vogel (12) und Davies (18) an, die ebenfalls die zunehmende Anaplasie und Dedifferenzierung des Gewebes als Beurteilungskriterien für die Malignität eines Tumors heranzogen.

Der Vergleich der Tumorzellen mit embryonalen Gliazellen, den Bailey und Cushing zur Klassifikation benutzten, wurde ebenso vielfach übernommen, zum Teil mit Modifizierungen wie bei Rubinstein (68) oder Ostertag (59), der als Matrix für die Blastome eine "Gewächszelle" sui generis annahm, und die Vorstellung, daß die Tumorzellen ein bestimmtes Entwicklungsstadium der Gliahistogenese repräsentieren, als "irrig" abtat. Auch Zülch (83) beruft sich auf das Gliederungsprinzip von Bailey und Cushing, und legt es weitgehend der von ihm 1979 initiierten und herausgegebenen WHO-Klassifikation zugrunde (82). Die Graduierung II bis IV dieser Klassifikation basiert zwar auf histologischen Kriterien der Malignität, bezieht sich aber auf eine Einschätzung des gewöhnlichen klinischen Verhaltens der Tumoren.

Die Einteilung der Malignität von Kernohan et al. (41) ist durch klinische Verlaufsstudien belegt (44). Die Malignitätsgrade 1, 2, 3 und 4 lassen sich folgendermaßen auf die WHO-Klassifikation übertragen: 1 entspricht II, 2 = III, 3 und 4 = IV.

Die von fast allen Autoren in gleicher Weise bewerteten Anzeichen für Anaplasie und Dedifferenzierung, die die oben genannten histologischen Kriterien für Malignität darstel-

len, sind im einzelnen erhöhte Zelldichte, Mitoserate und atypische Mitoseformen, Pleomorphie der Tumorzellen und des Gewebsaufbaus, Nekrosen, abnorm deutliche, ungeordnete, zum Teil überschießende Stromareaktion, und Bildung von pathologischen Blutgefäßen mit Endothelproliferation, die anfänglich vermehrt erscheinen, später Schlingen und Knäuel bilden.

Nach der WHO-Einteilung werden die astrocytären Tumoren wie folgt klassifiziert (60, 82):

1. Das Astrocytom, hauptsächlich aus Astrocyten bestehend, als fibrilläres, protoplasmatisches oder gemistocytisches Astrocytom, im allgemeinen Grad II.
2. Das gemischte Oligo-Astrocytom, den oligodendroglialen Tumoren zugeordnet, Grad II.
3. Das anaplastische (maligne) Astrocytom, histologisch Grad III.

In der Gruppe der Glioblastome, die den schlecht differenzierten und embryonalen Tumoren zugeordnet werden, sind auch Tumoren mit herdförmiger astrocytärer Differenzierung enthalten; Tumoren mit herdförmiger oligodendrocytärer oder ependymärer Differenzierung werden ebenfalls dieser Gruppe und dem Grad IV zugeordnet. Als Variante gilt das gigantozelluläre Glioblastom.

Zülch (83) sieht demnach das Glioblastom als eine eigene Tumorart, und erkennt dieses als den "echten Krebs des Gehirns". Auch für McMenemey (51) gibt es ein "Glioblastom ab initio", dessen vollständige Undifferenziertheit keinen Vergleich mit Tumoren zuläßt, deren Zellen reifen Gliazellformen ähneln. Nach Ansicht von Bailey (3) besteht die Möglichkeit, daß sich ein "Glioma multifforme" durch Entdifferenzierung protoplasmatischer Astrocyten entwickelt, denn er vertritt die These, daß ein Tumor entweder von embryona-

len Zellen ausgeht, die sich differenzieren, oder aber von ausgereiften Zellen ausgeht, die sich entdifferenzieren. Daraus erklärt sich für Bailey, "daß nur sehr selten Geschwülste vorkommen, die aus einer einzigen Zellart bestehen", daß in einem Tumor ein Nebeneinander von differenzierten Gliazellen und/oder unreifen Zellformen zum histologischen Bild gehört, und daß auch in einem Astrocytom "einige wenige Oligodendrogliazellen und viele nicht näher definierbare Zellen von unbestimmter Art" auftreten (3, 4).

Nach Stochdorph (74) kommen dabei unterschiedliche Konstellationen vor: die einzelne Tumorzelle kann unvollständig differenziert sein und sich so von den ausdifferenzierten Gliazellformen abheben. Zellformen mit unterschiedlichen Anklängen an differenzierte Gliaformen liegen als Ergebnis bivalenter, inäqualer Teilungen bunt gemischt vor, oder geschlossene Felder mit astrocytärer oder oligodendrocytärer Differenzierung wechseln sich ab, wahrscheinlich als Ausdruck der Proliferation einzelner Tumorzellklone (74).

Die schon lange beschriebene und auch aus diesen Bildern deutlich ersichtliche Heterogenität des Tumorgewebes ist in letzter Zeit als ein allgemeines Phänomen erkannt worden, das vor allem bei der Behandlung der Tumoren eine wichtige Rolle spielt (36). Neben der Überzeugung, daß Tumorzellen genetisch instabil sind (Nowell in Frost 26) und daß deshalb endogene Strukturveränderungen innerhalb des Zellgenoms Heterogenität bewirken, werden von verschiedenen Autoren auch äußere Einflüsse angenommen. Heppner (36) sieht die Variabilität zum einen in genetischen, zum anderen in nicht-genetischen oder epigenetischen Prozessen begründet; auch Frost und Kerbel (26) sehen keine Gegensätzlichkeit zur Theorie der Strukturveränderungen, wenn sie epigenetische Veränderungen als Erklärung vorschlagen.

Die zelluläre Heterogenität muß nach Heppner (36) sogar als ein Merkmal sowohl des normalen wie auch des praecancerogenen Gewebes angesehen werden, wobei die Kombination

vererbbarer mit milieubedingter Variabilität für die natürliche Entwicklung wie für das Tumorwachstum eine Rolle spielen.

Die Möglichkeit, daß Wechselwirkungen zwischen bestehenden Subpopulationen eines malignen Tumors das Ausmaß der Entstehung neuer Varianten beeinflusst, stellt ebenfalls eine wichtige Überlegung dar (64).

Zusammenfassend ist zu sagen, daß Gliazelltumoren durch Proliferation und Differenzierung neu entstandener Zellpopulationen entstehen. Dabei ist die Differenzierung nicht unabänderlich präformiert, sondern unterliegt Einflüssen zum Beispiel aus dem Gewebsmilieu. Daher sind auch Gliazelltumoren praktisch nie in ihrer Zusammensetzung völlig einheitlich; sie werden aber üblicherweise nach dem vorherrschenden Zelltyp benannt.

2. Literaturübersicht

2.1. Immunhistochemie

Immunhistologische Methoden werden in zunehmendem Maß zur Erstellung und Untermauerung von Diagnosen verwandt.

Bei diesen Verfahren werden zelleigene Antigene, meist membrangebundene oder frei im Cytoplasma vorliegende Proteine, mit Hilfe von Antigen-Antikörper-Reaktionen zur Auffindung bestimmter Zellen oder Zellstrukturen benutzt, indem die entsprechenden Antikörper mit einem "Farbträger" (Fluoreszenz- oder Absorptionsfarbstoff) markiert und so die Bindungen an die Antigene sichtbar gemacht werden.

Technische Probleme und zum Teil daraus resultierende Unzuverlässigkeiten schränkten die Anwendung immunhistologischer Verfahren lange Zeit sehr stark ein. Im Lauf der Weiterentwicklung und Verbesserung dieser Verfahren wurden zuerst Immunfluoreszenzmethoden verwandt, bei denen die Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Die relativ schnelle Abnahme der Fluoreszenzintensität und die sich daraus ergebende geringe Haltbarkeit der Präparate sind die wesentlichen Nachteile dieser Methoden.

Einen deutlichen Fortschritt in Hinblick auf die allgemeine Anwendbarkeit der Immunhistochemie stellen die immunhistochemischen Verfahren von Sternberger et al. (73) dar. In der Originalmethode wird ein Antikörper gegen das Gewebsantigen eingesetzt, mit dem der zweite Antikörper reagiert. An diesen zweiten Antikörper bindet der dritte Antikörper, der spezifisch für Peroxidase ist. Nach Inkubation mit einer Peroxidase und anschließend mit einer Farblösung als Substrat für die Peroxidase wird die Lokalisation des Antigen-Antikörper-Komplexes im Gewebe sichtbar (80).

Die Empfindlichkeit dieser "indirekten", weil mehrschichtigen Methoden ist zum Teil 20-200 mal höher als die anderer

immunhistochemischer Techniken. Durch die Bindung mehrerer sekundärer Antikörper an einen Antikörper-Komplex des ersten Serums entsteht ein Multiplikationseffekt, so daß höhere Verdünnungen des ersten Serums angewendet werden können.

Das in dieser Arbeit eingesetzte Verfahren ("Indirekte Immunperoxidase-Technik") stellt insofern eine Verbesserung dar, als ein Peroxidase-gekoppeltes Antiserum als zweites Serum verwandt wird. In diesem Serum ist die Peroxidase kovalent an den Antikörper gebunden, so daß ein Verbindungsantikörper unnötig ist. So wird ein Hauptnachteil der vorhergenannten Methode vermieden, nämlich der Verlust an nur schwach gebundener Peroxidase beim Waschvorgang.

Falsch-positive Ergebnisse können sich aufgrund einer Reaktion der besonders in Erythrocyten und Leukocyten enthaltenen endogenen Peroxidase mit dem Farbstoff ergeben, anstelle oder neben der Reaktion mit dem immunologisch gebundenen Enzym. Um diese unerwünschte Aktivität der endogenen Peroxidase zu blockieren, werden die Präparate zu Beginn des Verfahrens mit Wasserstoffperoxid inkubiert. Der Blockierungseffekt des Wasserstoffperoxid kann durch nachfolgende Behandlung mit Perjodsäure (als Oxidationsmittel) und Natriumborhydrid (als Reduktionsmittel) verstärkt werden, so daß eine Reaktion der endogenen Peroxidase im weiteren Verlauf auszuschließen ist.

Ebenfalls falsch-positive Ergebnisse kommen durch die "unspezifische Hintergrundfärbung" zustande, die durch Bindung der Proteine des ersten Antiserums an geladene Partikel im Schnittgewebe entsteht. Um diese Reaktion zu vermeiden, wird vor dem ersten, spezifischen Antiserum ein unspezifisches Normalserum zugegeben, das die geladenen Bindungsstellen besetzt und so eine Adsorption des ersten Antikörpers verhindert (11).

Um aus der Farbreaktion korrekte Rückschlüsse auf die vorhandene Antigenmenge ziehen zu können, muß die geeignete

Konzentration der jeweiligen Antiseren an Hand von Verdünnungsreihen bestimmt werden. Bei zu hoher Verdünnung werden nicht alle Antigenstellen besetzt, so daß das Ergebnis als unvollständig und die erkennbare Antigenmenge als zu gering angesehen werden muß (80).

Mit Hilfe der immunhistochemischen Verfahren können physiologische und pathologische Vorgänge an und in der Zelle bzw. im Gewebe erkannt und erforscht werden.

Mit Immunfluoreszenzmethoden werden Stoffe im Gewebe kenntlich gemacht, eine genaue Lokalisierung der Reaktionsstellen ist jedoch nicht immer möglich. Die immunhistochemischen Verfahren erlauben nicht nur eine exakte Zuordnung einzelner Zellen im Gewebsverband, sondern sogar eine Kennzeichnung einzelner cytologischer Strukturen. Diese Strukturen, z.B. Fibrillenbündel als Stützelemente der Zellen, wurden bisher mittels Elektronenmikroskopie erfaßt und beschrieben, konnten aber nicht näher unterschieden werden. Mit der Anwendung antigenspezifischer Immunsereen ist es heute möglich, Strukturen oder auch Zellprodukte nach ihrem Proteincharakter zu identifizieren und einzeln darzustellen. So kann neben der histologischen auch eine cytochemische Diagnostik betrieben werden.

Die Immunhistochemie sollte nicht als Ersatz für die gängigen histologischen Färbemethoden angesehen werden, sondern als Ergänzung bei einer möglichst umfassenden Sammlung von Kriterien für eine exakte Diagnosestellung.

2.2. Spezifische Proteine als Antigene

2.2.1. Saures Gliafaserprotein

Eng et al. (23) isolierten bei Analysen alter, besonders fibrillenreicher MS-Plaques ein Protein, das sie in den ersten Publikationen von 1970 noch als "Plaque-Protein" bezeichneten. Später änderte sich die Benennung in "saures Gliafaserprotein" ("glial fibrillary acidic protein" = GFAP), nachdem mittels Aminosäureanalysen die Zusammensetzung des Proteins festgestellt worden war und es sich als Bestandteil der Gliafilamente erwiesen hatte.

Gheuens et al. (27) vertreten die Meinung, daß gereinigtes α -Albumin wasserlösliches GFAP darstellt.

GFAP ist ein wasserunlösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 47 - 49 kDa, das ca. 30% saure und 15% basische Reste enthält (23). Die als "wasserlösliches GFAP" beschriebenen Formen mit Molekulargewichten zwischen 39 und 47 kDa stellen offensichtlich proteolytische Fragmente von GFAP dar, die mit abnehmendem Molekulargewicht zunehmend saurer werden, und möglicherweise durch eine Calcium-abhängige Protease in situ entstehen (8). Inwieweit dieser Prozeß in vivo relevant ist, ist noch nicht geklärt (8, 27).

Aufgrund der starken antigenen Eigenschaften von GFAP konnten Antiseren gewonnen werden, die mittels immunologischer Verfahren genauere Untersuchungen möglich machten.

So wurde mit Hilfe der PAP-Methode nach Sternberger et al. (73) GFAP als Antigen auf Zellebene sichtbar gemacht und die Lokalisation des Proteins in der Zelle und im Gewebe bestimmt (68). Die Ergebnisse dieser immunhistologischen Forschungen ergaben mit wenigen Ausnahmen, daß sich GFAP nur in Astrocyten befindet (23), wobei sich unterschiedlich starke Reaktionen bei den verschiedenen Zelltypen zeigen (21, 23).

In normalem Hirngewebe bilden protoplasmatische Astrocy-

ten mit nur geringem Filamentgehalt wenig GFAP, während fibrilläre Astrocyten meist reichlich Filament im Zelleib und in den Fortsätzen enthalten und sehr stark GFAP-positiv reagieren. Die Umwandlung von protoplasmatischen in fibrilläre Formen als Reaktion auf pathologische Prozesse zeigt sich in einer deutlichen Vermehrung von GFAP. Gemistocyten weisen das Protein vor allem im Cytoplasma auf (21).

Die Frage, ob GFAP auch in Ependymzellen vorhanden ist, ist noch nicht eindeutig geklärt (22).

Choi et al. (15) untersuchten das Vorkommen von GFAP in embryonalen Zellen des Rückenmarks, die nach cytologischen, ultrastrukturellen und immunhistochemischen Kriterien als Oligodendroglia angesehen werden müssen. Sie kamen zu dem Schluß, daß Myelin-bildende Oligodendroglia, die in einer frühen Entwicklungsphase GFAP synthetisiert und durch Differenzierung von Astroglia entsteht, GFAP nur vorübergehend exprimiert. In reifen Oligodendrocyten ist kein GFAP nachzuweisen.

Das Phänomen der unterschiedlichen GFAP-Expression der verschiedenen Astrocytenzelltypen hängt mit der Bildung eines Cytoskelettes in der Zelle zusammen. Diese intracytoplasmatisch gelegenen Stützelemente bestehen aus Fibrillenbündeln, die schon früher mittels der Elektronenmikroskopie gesehen, aber nicht näher zugeordnet worden waren. Mit den Möglichkeiten der Immunhistochemie können heute ganze Zellverbände und Gewebsteile untersucht werden; die Beobachtungen sind nicht mehr wie bei der Elektronenmikroskopie auf die Beschreibung nur einer Zelle beschränkt.

GFAP wurde nach der Identifizierung als Hauptbestandteil der Astrocytenfibrillen (23) den Intermediärfilamentproteinen zugeordnet (2, 10, 21, 58, 78).

Intermediärfilamente werden nach ihrer Stärke von 7-11 nm zwischen den Mikrofilamenten (5-7 nm) und den Mikrotubuli (22-25 nm) eingeordnet, und bilden in fast allen Wirbeltierzellen ein intrazelluläres Cytoskelett, ausgenommen die

Keimzellen und Zellen früher Embryonalstadien. Intermediärfilamente werden elektronenmikroskopisch erkannt und von anderen Cytoskelettelementen unterschieden. Trotz morphologischer Ähnlichkeit weisen sie biochemische und immunologische Heterogenitäten auf, und können gemäß ihrer verschiedenen Proteinuntereinheiten unterteilt werden (10). Folgende Gruppen werden beschrieben:

1. Cytokeratin, charakteristisch für epitheliale Zellen,
2. Neurofilament, in den meisten Neuronen vorhanden,
3. GFAP, spezifisch für Astrocyten und pathologisch veränderte Ependymzellen,
4. Desmin, in Skelett- und Herzmuskelzellen und in Zellen der glatten Muskulatur,
5. Vimentin, charakteristisch für Zellen mesenchymalen Ursprungs, z.T. aber auch in anderen Zellarten, vor allem in frühen Differenzierungsstadien.

Die meisten Zellen enthalten nur ein einziges spezifisches Intermediärfilament, wobei in den Fällen, in denen zwei verschiedene Filamentproteine in einer Zelle vorkommen, das eine immer Vimentin ist. Beispiele hierfür sind u.a. Astrocyten und Zellen der glatten Muskulatur (10, 58).

Kreuzreaktionen zwischen den Antiseren der Intermediärfilamentgruppen können vorkommen, sind aber nicht häufig (10).

Über die chemischen, physikalischen und immunologischen Eigenschaften von GFAP besteht heute noch keine allgemeine Übereinstimmung (23); auch über die Beziehung zwischen morphologischer Differenzierung und Erscheinen und Verteilung der Gliafilamente ist bisher wenig bekannt.

Trimmer et al. (78) beobachteten bei der Entwicklung und Differenzierung von Astroglia aus dem Nervus opticus von neugeborenen Ratten, daß unreife, polygonale Astroblasten trotz einer Anfärbbarkeit mit GFAP-Antiserum nur geringe

Mengen an Gliafilament enthalten. Stattdessen werden in frühen Entwicklungsstadien Mikrotubuli als Hauptbestandteil des Cytoskelettes gefunden, die später reduziert und allmählich durch Intermediärfilamente ersetzt werden.

Die positive Reaktion auf das GFAP-Antiserum konzentriert sich in den frühen Astroblasten um den Kern oder ist im Cytoplasma schwach verteilt. Im Lauf der Entwicklung erscheinen zwischen Kern und Plasmalemm radiär angeordnete "Säulen", die intensive Färbung zeigen. Diese "Säulen" entsprechen ultrastrukturell parallelen Bündeln von Gliafilamenten und Mikrotubuli. Der Differenzierung dieser Bündel zu gut abgrenzbaren Fortsätzen mit immer mehr Filamenten und immer weniger Mikrotubuli entspricht auch die deutliche GFAP-positive Reaktion. "Reife" Astrocyten sollen demnach gleichmäßig und intensiv mit GFAP-Antiserum reagieren, wobei die Zellkörper und die Fortsätze zahlreiche Filamentbündel aufweisen, aber kaum Mikrotubuli mehr (78).

Beim Bestreben, neue Kenntnissen über Bedeutung, Vorkommen und Eigenschaften des Proteins zu gewinnen, werden zunehmend immunologische Verfahren angewandt. Vor allem der Einsatz monoklonaler Antikörper (17) ist erfolgversprechend, insbesondere hinsichtlich der Analyse dreier verschiedener Epitope auf dem GFAP-Molekül (2).

GFAP wird als einer der wichtigsten und zuverlässigsten Marker für Nervengewebe angesehen (10), da es spezifisch für Astrocyten sein soll und der positive Nachweis in einer Zelle die Annahme ihrer astrocytäre Herkunft oder Differenzierung nahelegt (29). So werden GFAP-Antiseren zur Identifizierung von Astrocyten in vivo und in vitro eingesetzt (71), z.B. in Myelin-enhaltenden und Myelin-freien Gewebekulturen (79), oder zur Identifizierung etablierter Zelllinien aus einem spontanen Maus-Astrocytom (62).

Ogbleich GFAP ein zell- und nicht ein tumorspezifisches Strukturprotein ist (19), findet es immer mehr Anwendung in der Tumordiagnostik (16, 21, 22, 23, 50, 68).

Eng (23) weist in diesem Zusammenhang auf die besondere Bedeutung von GFAP bei dem Nachweis astrocytärer Zelldifferenzierung in primitiven oder anaplastischen ZNS-Tumoren und bei der Problematik der gemischten Tumoren hin. Menge und Lokalisation von GFAP lassen Rückschlüsse auf den vorherrschenden Zelltyp in einem Tumor und auch den Grad der Zelldifferenzierung zu, so daß neben den histologischen Anhaltspunkten zusätzliche Kriterien für die Beurteilung eines Gehirntumors gewonnen werden können (23).

2.2.2. S-100-Protein

Bei der Suche nach Nervengewebe-spezifischen Proteinen, mit deren Hilfe Zelleigenschaften näher bestimmt werden können, fanden Moore et al. (54) 1964 ein Protein, das sie S-100 nannten und dessen Präparation und Eigenschaften 1965 erstmals veröffentlicht wurden.

S-100 ist ein saures Protein (isoelektrischer Punkt bei pH 4,3-4,5), das seine Bezeichnung daher erhielt, daß es in gesättigtem Ammoniumsulfat bei pH 7 gut löslich ist. Das Auftreten verschiedener Banden bei Elektrophoresen ließ auf das Vorhandensein von mehreren Untereinheiten schließen, durch deren Kombination die Heterogenität des Proteins zustande kommt.

Isobe et al. (in Moore, 54) bestimmten die Aminosäuresequenzen der α - und β -Untereinheiten. Die α -Untereinheit hat 93 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 10,4 kDa, während die β -Untereinheit 91 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 10,5 kDa aufweist. Beide Sequenzen zeigen eine Homologie von 60% miteinander. Das Molekulargewicht der S-100-Dimeren errechnet sich zu 21 kDa. Nach der Art der Zusammensetzung werden heute drei Arten von S-100 unterschieden. S-100 a ($\alpha\beta$), S-100 b ($\beta\beta$) und S-100 ao ($\alpha\alpha$). Baudier et al. (6) beschreiben eine weitere Untereinheit

α' , so daß als weitere Form S-100 a' (α' ' β) auftreten könnte.

Die Entwicklung von Antiseren gegen S-100 (1965 durch Levine & Moore) erlaubte genauere Erforschung von Lokalisation, Eigenschaften und Menge des Proteins. So wurden S-100 a und S-100 b sowohl im Cytosol bestimmter Zellen als auch membrangebunden identifiziert (5, 53). Kimura et al. (43) beschreiben S-100 auch in Zellkernen.

Moore (54) bezeichnet S-100 als spezifisch für das Nervensystem, wobei es in allen Teilen des ZNS, mit deutlichen quantitativen Unterschieden bei verschiedener Lokalisation, und in peripheren Nerven sowie Ganglien nachgewiesen werden kann. Den Hauptanteil synthetisieren Astrocyten, Oligodendrocyten und Schwann'sche Zellen, eventuell geringe Mengen auch Neuronen.

Viele Autoren (5, 6, 7, 10, 21, 24, 30, 37, 43, 49, 52, 56, 71, 72) gehen bei ihren Forschungen über S-100 ebenfalls von seiner Spezifität für das Nervengewebe aus.

Kahn et al. (40) fanden aber bei ihren Untersuchungen über den Einsatz des S-100-Antikörpers für diagnostische Zwecke S-100-Antigen auch in nicht-neuronalen Normalgeweben wie Hautdrüsen, Lymphknoten, Milz, Knorpel etc., sowie in verschiedenen nicht-neuronalen Tumoren. Auch Molin (53), Roholl et al. (66) und Takahashi et al. (75) beschreiben das Vorkommen von S-100-Antigen nicht nur in Gliazellen.

Obgleich die Funktion von S-100 noch weitgehend unbekannt ist, nimmt man eine Verbindung zu den Ca^{2+} -bindenden Proteinen wie Calmodulin, Troponin C und Parvalbumin an (5, 20). So werden Konformationsänderungen der Proteinformen a und b bei Ca^{2+} Anwesenheit beobachtet (20, 53), ebenso wie die Bindung an verschiedene Membrantypen Ca^{2+} zu erfordern scheint (54). Eine zu anderen Ca^{2+} -Bindungsstellen homologe Sequenz ("EF-Hand") ist in der α - und in der β -Untereinheit konserviert. Die Rolle des S-100-Proteins beim Auf- und/

oder Abbau von Mikrotubuli, wesentlich für die Funktion des Cytoskelettes in Gehirnzellen, wird von mehreren Autoren diskutiert (5, 20).

Die Frage, inwieweit S-100 als Tumormarker verwendet werden kann, findet verschiedene Antworten. Haan et al. (30) gehen von der Glia-Spezifität von S-100 aus und markieren mit einem S-100-spezifischen, monoklonalen Antikörper Astrocyten in Präparaten und Zellkulturen, Nakajima et al. (56) verwenden S-100 bei der Diagnostik von Melanomen.

Für Roholl et al. (66) zeigt S-100 keine ausreichende Gewebsspezifität, auch muß ihrer Ansicht nach das Verteilungsmuster des Proteins und seiner Untereinheiten für die Immundiagnostik noch genauer untersucht werden. Deshalb lehnen sie, ebenso wie Schubert (71), S-100 als Marker für bestimmte Zelltypen ab.

2.3. Zellkulturen

1925 gelang es erstmals, Zellen eines malignen Glioms des ZNS für einige Wochen in Kultur zu halten (46, 48).

Versuche, sich die unbegrenzte Wachstumsfähigkeit von Tumorzellen zur genaueren Erforschung von Gehirntumoren zunutze zu machen, waren schon längere Zeit unternommen worden, aber der wirkliche Durchbruch auf diesem Gebiet gelang Ende der zwanziger Jahre, als Veröffentlichungen über die Kultivierungserfolge bei Meningiomen, Glioblastomen, Astrocytomen und Acusticusneurinomen erschienen.

Mit der Einführung des Phasenkontrastmikroskopes, der Antibiotika-Behandlung und neuer Techniken in der Behandlung der Zellkulturen (Einsatz von "Roller-Tubes") wurde die Zellkulturzüchtung deutlich erleichtert und damit auch in zunehmendem Maß angewandt.

Das unterschiedliche Verhalten der verschiedenen Gewebe in vitro veranlaßte die Entwicklung differenter Kulturtypen.

So unterscheidet man zwischen "short term"-Kulturen, die mit nur wenigen Passagen innerhalb einiger Tage als nicht permanente Zelllinien anzusehen sind, und "long term"-Kulturen. Die Zellen dieser Zelllinien, die nach mehr als 30 Passagen als etabliert gelten, entwickeln durch spontane Transformation heteroploide Chromosomensätze und sind aufgrund dieser Anomalie zu "unbegrenztem Leben" ohne Änderung des Zellcharakters fähig.

Weiterhin wird zwischen "Monolayer"- und "Organ"-Kulturen unterschieden, wobei erstere die Zellen in nur einer Schicht enthalten, während in Organkulturen Fragmente embryonaler oder adulter Organe unter Beibehaltung des Gewebsverbandes unter Kulturbedingungen gehalten werden.

Der Sinn und Zweck der Zellkulturen besteht darin, Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg in kontrollierter Umgebung zu beobachten und daraus Rückschlüsse auf physiologische und pathologische Vorgänge in vivo ziehen zu können. So werden Entwicklungen verfolgt, die durch die "Momentaufnahme" des histologischen Schnittes nicht erkennbar zu machen sind.

Aufgrund von unbeschränkter Nahrungszufuhr und dem Fehlen physikalischer Grenzen können sich die Zellen ungehemmt entwickeln und zeigen ihren "wahren morphologischen Charakter" (45). Zellbewegungen, Teilungsrate, Wechselwirkungen zwischen den Zellen, Morphogenese und Differenzierung werden erforscht, aber auch Anpassung und reversible Veränderung der Zellformen als Antwort auf umweltbedingte Einflüsse (45, 46, 67). Die Zusammensetzung der Nährlösung, die Technik der Zellkultivierung, die Temperatur und weitere Parameter bestimmen nicht nur die Geschwindigkeit der Zellmigration und die Etablierung von Populationen, sondern auch die Morphologie der Zellen in vitro (45). So kann z.B. durch den Einsatz von konditioniertem Medium (Standardmedium, das 24 h mit einer "Monolayer"-Kultur einer humanen Gliomzelllinie inkubiert wurde) eine vermehrte Koloniebildung einzelner Gliom-

zellen erreicht werden, gleichzeitig besteht auch ein Einfluß auf die Zellgestalt bezüglich der Ausbildung fibrillärer Fortsätze (14).

Gliazellen eignen sich sehr gut für vergleichende Studien von normalen und neoplastischen humanen Zellen in vitro (48, 63). Unter standardisierten Bedingungen herrscht ein gleichmäßiges Wachstumsmuster vor, abhängig von der Zellart des Ausgangsmaterials (21), bzw. dem Grad der Malignität des Tumors.

Die grundlegenden Ergebnisse aus Zellkulturen von Astrocytomen sind in den Arbeiten von Kersting (42) und Lumsden (46) exemplarisch dargestellt.

Duffy (21) beschreibt folgende Entwicklungen bei Tumoren der astrocytären Reihe: bei Explantaten von Astrocytomen Grad I und II bilden sich nach 24 - 48 h dünne Fortsätze aus den Rändern rund um das Gewebstück, entwickeln sich zuerst zu bipolaren, dann zu flachen polygonalen Zellen, um letztlich das ausdifferenzierte, sternförmige Stadium zu erreichen. Explantate maligner Astrocytome weisen ein anderes Wachstumsverhalten auf. Sie zeigen eine schnelle Ausbildung bipolarer Zellen, die von Anfang an durch eine größere Variation in der Zellgestalt (Spindelzellen, flache, polygonale Zellen) gekennzeichnet sind und eine erhöhte Mitoserate sowie abweichende Bewegungsmuster der Einzelzelle aufweisen. Zwar können bei Kulturen aus malignen Tumoren auch "sternförmige" Zellen vorkommen, sie sind aber meistens unregelmäßiger bis grotesk geformt.

Auch für Liss (45) ist das frühe, deutlich ausgeprägte Auswachsen ein charakteristisches Merkmal von Glioblastomzellen in Kultur, ebenso wie der Pleomorphismus mit mehrkernigen Riesenzellen neben langen Spindelzellen und polygonalen epithelähnlichen Zellen. Die Zellen astrocytären Ursprungs beschreibt er ebenfalls in verschiedenen Formen, mit

mehr oder weniger deutlich ausgeprägten Fortsätzen, z.T. nicht zu unterscheiden von normalen Astrocyten (33, 45).

Zellkulturen aus Oligodendrogliomen setzen sich aus bi- bzw. multipolaren Zellen zusammen, wobei sich die eine in die andere Zellform verändern kann. Als diagnostisches Merkmal gilt der charakteristische Hof und die Pulsation der Zellkörper (45).

Die Möglichkeit, undifferenzierte Zellen aus Kulturen maligner Tumoren zu einer Differenzierung mit Ausbildung langer, verästelter Fortsätze zu veranlassen, zeigen Versuche mit dBcAMP (Dibutryl Cyclic AMP) als Mediumzusatz (21, 78).

So beschreiben auch Haynes und Weber (33) eine gliale Differenzierung in Primärkulturen humaner Hirntumoren durch Behandlung mit dBcAMP, die sich u.a. in dem Erscheinen von Mikrofilamentbündeln in den Zellen ausdrückt. Das dabei beobachtete Verschwinden von Mikrotubuli und das Abnehmen von Gliafilamenten im Cytoplasma läßt sich allerdings nicht mit einer Differenzierung vereinbaren. Raju et al. (65) führten entsprechende Untersuchungen bei dem C-6 Rattengliom durch und kamen zu entgegengesetzten Ergebnissen, nämlich zu einer "dramatischen" Vermehrung von GFAP-positiven Zellen in Monolayer-Kulturen (65).

Die Differenzierung von Astrocyten in vitro ist Gegenstand der Untersuchungen von Trimmer et al. (78), die besonders auf die Beziehung zwischen morphologischer Reifung der Astrocyten und der Bildung und Verteilung von Gliafilamenten eingehen (siehe auch unter 2.2.1.).

Osborn und Weber (58) haben festgestellt, daß im allgemeinen Zellen aus Kulturen die gleichen Intermediärfilamentproteine exprimieren, die auch für das ursprüngliche Tumorgewebe typisch waren. Allerdings gibt es Berichte, nach denen GFAP nach einigen Passagen aus den Tumorzellen verschwindet (77).

Der Nachweis von GFAP ist in der Zellkulturforschung ein

wichtiges Kriterium bei der Erkennung und Zuordnung von unreifen Zellen oder untypischen Zellformen. Ebenso kann mit Hilfe der GFAP-Expression zwischen reifen und undifferenzierten Astrocyten unterschieden werden, da unter den in vitro-Bedingungen ein hoher Prozentsatz der "reifen" Astrocyten GFAP-positiv reagieren (65).

Die unterschiedliche Expression von GFAP sowie von Oberflächenantigenen bei Zellen maligner Astrocytome, die mittels monoklonaler Antikörper analysiert wurden, wird von Cairncross et al. (13) zur Unterteilung der Astrocytome in Untergruppen auf der Basis differenzierungsabhängiger phänotypischer Merkmale herangezogen.

Bei der Bewertung von an Zellkulturen gewonnenen Erkenntnissen stellt sich die grundsätzliche Frage, ob der histologische Charakter eines Tumors und sein Verhalten in der Zellkultur in Beziehung zu setzen sind.

Nach Meinung von Lumsden (46) stellen die Tumoren der astrocytären Reihe aufgrund ihrer besonderen Eigenschaft, lange, dünne Fortsätze und neurogliale Fasern in vitro wie in vivo zu bilden, das beste verfügbare System zur Erforschung der Übereinstimmungen zwischen histologischer Struktur und in vivo-Verhalten dar. Dies trifft vor allem während der frühen Stadien der Kultivierung zu. Bei der Auswertung repräsentativer Fälle kommt Lumsden (46) zu dem Schluß, daß eine Einordnung dieser Fälle nach zunehmender histologischer Malignität mit der Einordnung in vitro übereinstimmt. Da demnach die verschiedenen Gliomtypen in ihrem Kulturverhalten ebenso charakteristisch sind wie im histologischen Präparat, kann die Zellkultur bei der Tumordiagnostik eine entscheidende Hilfe bedeuten.

3. Problemstellung

Bei der Untersuchung von Gliomen auf ihren Gesamtgehalt an GFAP ist eine unterschiedliche Proteinoxpression sowohl in verschiedenen Tumorearealen als auch in verschiedenen Zelldifferenzierungen zu erkennen. Bei dem Vergleich von Astrocytomen mit Ependymomen und Oligodendroglomen wird deutlich, daß das Gliafaserprotein nicht exklusiv in Astrocytomen vorkommt, sondern in erkennbarer Menge auch in ependymären und oligodendrocytären Zellen auftritt (22, 28, 29, 43, 81). Dieser Befund entspricht weitgehend den Ergebnissen bei Untersuchungen über die Normalverteilung von GFAP (68). Bei den erst genannten Untersuchungen wurden die Astrocytome als eine einheitliche Tumorgruppierung aufgefaßt und mit anderen Gliazelltumoren, z.B. den Ependymomen, verglichen. Obgleich auf diese Weise keine wesentlichen neuen Erkenntnisse zu gewinnen sind, können jedoch neue anatomische Ansichten über die Herkunft der Gliapopulationen (57) bestätigt werden.

Unberücksichtigt blieb bei den bisherigen Untersuchungen die Frage, ob die Gruppe der Astrocytome tatsächlich eine in sich einheitliche Tumorgruppierung darstellt.

Häufig wird von der Annahme ausgegangen, daß die hochdifferenzierten Tumormformen eine bevorzugt monomorphe Zelldifferenzierung aufweisen. So soll ein fibrilläres Astrocytom nur aus fibrillenreichen Astrocyten, ein gemistocytisches Astrocytom nur aus Gemistocyten aufgebaut sein. Überraschend selten ist eine kritische Anmerkung zu finden, daß eine derartige "übliche Unterteilung in diese beiden Varianten des Astrocytoms ... jedoch dem tatsächlichen Erscheinungsbild nicht gerecht (wird)" (55).

Tatsache ist, daß fast bei allen Astrocytomen auch andere Gliadifferenzierungen auftreten können (12, 67, 82), und daß die endgültige Trennung in oligodendrocytäre und astrocytäre Differenzierung erst zu einem späten Zeitpunkt der Entwick-

lung sichtbar wird, so daß über lange Entwicklungsphasen hinweg keine strikte Unterscheidung möglich ist (15, 57, 61). Ebenso ist seit längerer Zeit das Problem einer indifferenten Glia bekannt (57). Dennoch haben diese Aspekte bislang keine ausreichende Beachtung gefunden.

Für die vorliegende Arbeit wurden Astrocytome niedrigen bzw. hohen Malignitätsgrades und Glioblastome als Untersuchungsmaterial ausgewählt. Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden wurde die Expression glia-assoziiierter Proteine (GFAP und S-100) bei diesen Tumoren dargestellt. Zusätzlich wurden von einigen Tumoren Zellkulturen angelegt und die GFAP- bzw. S-100-Expression des Tumors mit der seiner Zellkultur in Vergleich gesetzt.

Dabei sollte vor allem untersucht werden, in welchem Umfang bei Astrocytomen und Glioblastomen bzw. bei den am Aufbau dieser Tumoren beteiligten Zellelemente GFAP und S-100 auftreten.

Die untersuchten Zellproteine gehören unterschiedlichen Klassen an, zum einen den strukturgebundenen, zum anderen den frei löslichen Proteinen, und sind von hoher Spezifität für gliales Gewebe. Daher besteht die Erwartung, daß es sich um zwei wesentliche Bestandteile hochdifferenzierter glialer Tumorzellen handeln müsse, und nicht nur um zufällig in glialen Tumoren auftretende Substanzen.

Es stellt sich somit die Frage, ob die Expression von GFAP und S-100 parallel zu den rein morphologisch gegebenen Einteilungen der Astrocytome und Glioblastome auftritt, oder ob sich unter Umständen davon abweichende Gruppierungen ergeben. Dies könnte Auswirkungen auf die Abgrenzung zwischen niedrig- und hochdifferenzierten Gliomen haben und damit Verschiebungen in der Beurteilung der Dignität bewirken.

4. Material und Methodik

Für die vorliegende Arbeit wurden 143 Fälle humaner Gehirntumoren aus der Gruppe der Astrocytome und Glioblastome untersucht, davon 23 Astrocytome WHO-Grad II, 11 gemischte Oligo-Astrocytome WHO-Grad II, 57 Astrocytome WHO-Grad III und 52 Glioblastome.

Die Tumoren wurden in der Neurochirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München und in der Neurochirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Bogenhausen operiert.

Das Material wurde in 4% neutralem Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und in 5 µm dicken Schnitten mit Chrom-Gelatine aufgezogen.

Für die Immunperoxidase-Färbung wurden die Präparate in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Nach Spülen in Aqua dest. wurden die Schnitte 5 Minuten in 7,5% H_2O_2 , 5 Minuten in 2,28% wässriger Perjodsäure und 2 Minuten in 0,02% wässrigem Na-Borhydrid inkubiert, dazwischen jeweils in Aqua dest. gespült.

Anschließend wurden die Präparate 3 mal 15 Minuten in Phosphate-Buffered-Saline (PBS)-Puffer (12,7 g Na_2HPO_4 , 3,9 g NaH_2PO_4 , 85,0 g NaCl ad 10 l Aqua bidest., pH 7,2 - 7,4) gespült, nach vorsichtiger Trocknung des Objektträgers mit unspezifischem Kaninchen-Normalserum (1 mg auf 50 ml PBS-Puffer, 1:10 verdünnt mit PBS-Puffer) überschichtet und 5 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach vorsichtigem Abgießen des überstehenden Serums wurden die Schnitte erneut 3 mal 15 Minuten in PBS-Puffer gespült und anschließend nach vorsichtiger Trocknung mit dem spezifischen Serum überschichtet (Rabbit Polyclonal Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein, Dako Corporation, Santa Barbara, Ca., USA; Rabbit Polyclonal Anti-S-100, DAKOPATTS, Glostrup, Dänemark). Die Verdünnung der spezifischen Seren wurde mittels Verdünnungsreihen ausgetestet. Die Präparate

wurden in einer feuchten Kammer bei ca. 4°C im Kühlschrank über Nacht inkubiert.

Nach Abgießen des überstehenden Serums wurden die Schnitte 3 mal 15 Minuten in PBS-Puffer unter Zusatz von 1% Brij-Lösung (0,5 ml ad 100 ml PBS-Puffer) gespült, nach Abtrocknen mit Peroxydase-gekoppeltem Antiserum überschichtet (Horseradish Peroxidase Conjugated Anti-Rabbit IgG, Miles Scientific, Naperville, Il., USA; Verdünnung 1:480 mit PBS-Puffer) und 15 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert.

Anschließend wurden die Präparate 3 mal 15 Minuten in Brij-PBS-Lösung gespült und 30 Minuten in frisch angesetzte AEC-Farblösung gestellt (20 mg 3-Amino-9-ethylcarbazol, 12 ml Dimethylsulfoxid, 10 µl H₂O₂ ad 100 ml Michaelis-Puffer (20,6 g Barbitalnatrium (5,5 Diethylbarbitursäure-Na-Salz) ad 1000 ml Aqua bidest., pH 7,4)).

Nach Spülen in Aqua bidest. wurden die Schnitte 5 Minuten in Hämatein gefärbt, 10 Minuten unter fließendem Wasser gebläut und nach Spülen in Aqua dest. mit Glyceringelatine (Kaisers Gelatine) eingedeckt.

Als Kontrollschnitte wurden Präparate einer reaktiven Gliese verwandt.

Für die Zellkulturen wurde Operationsmaterial binnen 4 Stunden nach der Entnahme steril verarbeitet. Zur Vorabklärung des Befundes wurden Gefrierschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Ein Teil des Materials wurde nach Fixierung in Formalin und Einbettung in Paraffin als Schnittpräparate mit der Immunperoxidase-Färbung bearbeitet.

Geeignete Gewebstücke wurden nach der mechanischen Gewebedissoziationsmethode bzw. der Explantationsmethode in NUNC-Plastikflaschen (50 ml) verbracht, mit Anzuchtmedium (M 199 + 20% fetales bovines Serum (FBS), Antibiotika, Glutaminlösung) versehen und im offenen System bei 37°C, 6% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit bebrütet.

Der Gehalt an FBS wurde innerhalb von 14 Tagen in 3 Schritten von 20% auf 10% reduziert, M 199-Medium durch RPMI 1640 ersetzt.

Nach Anwachsen und Vermehrung wurde die Primärkultur nach dem Trypsinierungsverfahren 1:2 bis 1:10 geteilt. Nach mehreren Passagen wurden Lab-Teks (Miles Scientific, Naperville, Il., USA) angelegt, bis zur Konfluenz bebrütet und in 4% Formalin mindestens 30 Minuten fixiert.

Die Lab-Teks wurden in Aqua dest. gespült, 30 Minuten in 70% Alkohol gestellt und wieder in Aqua dest. gespült. Die Immunperoxidase-Färbung wurde ab der Behandlung mit 7,5% H_2O_2 in der gleichen Weise wie oben beschrieben durchgeführt, nur wurden geringere Verdünnungen der spezifischen Seren verwandt (mittels einer Verdünnungsreihe getestet) und die Spülungen erfolgten nur mit PBS-Puffer, ohne Brij-Zusatz.

Für den Färbeprozess wurden die Plastikammern auf den Objektträgern belassen und erst zum Eindecken entfernt.

Für Vergleichspräparate wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen durchgeführt.

5. Ergebnisse

Die Auswertungsergebnisse werden in Tabellenform dargestellt (siehe Anhang Tabelle 1).

Bei der Auswertung des Materials ergibt sich die Frage, inwieweit Reaktionsmenge und/oder -Intensität erfaßt und beschrieben werden können.

Obgleich die Intensität der sichtbaren Reaktion von verschiedenen äußeren Faktoren im Färbeprozess abhängig und ohne sichere Aussage zur Proteinkonzentration in der Einzelzelle ist, wird die Anzahl der Reaktionsstellen bewertet.

Die Präparate weisen bezüglich der sichtbaren Reaktivität nur eine begrenzte Variationsbreite auf, so daß schwerpunktmäßig vier Situationen beschrieben werden können:

1. keine Reagibilität,
2. vereinzelte, nicht regelmäßig verteilte Reaktionsstellen,
3. zahlreiche, nicht regelmäßig verteilte Reaktionsstellen,
4. viele, dicht und felderförmig gruppierte Reaktionsstellen, die bei geringer Vergrößerung (10 fach) das Blickfeld so gut wie vollständig ausfüllen.

Die begrenzte Anzahl identifizierbarer Zelltypen, die bei Astrocytomen und Glioblastomen im großen und ganzen unterschieden werden, wird in der Auswertung um zwei Zellarten erweitert.

Neben den für die WHO-Klassifikation maßgeblichen, von Zülch (83), Rubinstein (67) und Jänisch (39) dargestellten Zellformen fibrillär, protoplasmatisch, gemistocytisch, gigantozellulär und fusiform werden oligodendrocyten-ähnliche und undifferenzierte Zellen aufgeführt.

Oligodendrocytäre Tumorzellen, die in den gemischten Oligo-Astrocytomen in der "idealen" Zusammensetzung von 50:50, aber auch in jedem anderen Verhältnis der Populatio-

nen vorkommen, sind offensichtlich auch in anderen Tumoren vorhanden. In der Embryogenese der Gliazellen finden sich Hinweise darauf, daß die Vorläuferzellen für Astrocyten und Oligodendrocyten im histologischen Bild ein oligodendrocytäres Aussehen haben, so daß nicht eindeutig festgelegt werden kann, ob es sich bei diesen Tumorzellen um ausdifferenzierte Oligodendrocyten oder um eine Übergangsform einer noch gering, bzw. nicht endgültig differenzierten Tumorzelle handelt. Aus diesem Grund wird der Ausdruck "oligodendrocyten-ähnlich" verwendet.

Ebenso erscheinen die undifferenzierten, nicht hochgradig anaplastisch aussehenden Zellen mehrdeutig.

In Zellkulturen von explantiertem Tumorgewebe mit einem besonders hohen Gehalt an undifferenzierten Zellen entwickeln sich zum Teil makrogliale Zelllinien mit mittelgroßen bis großen Zellformen. Da hier nicht zu entscheiden ist, inwieweit eine anaplastisch undifferenzierte Zelle oder eine "Momentaufnahme" einer differenzierungsfähigen Zelle vorliegt, wird diese Zellform als eine eigene Gruppe ausgewertet.

Eine über diese zwei Formen der wenig differenzierten Zellen hinausgehende Unterteilung scheint für die cytologische Beurteilung weder sinnvoll noch realisierbar.

5.1. Auflistung

Siehe Anhang Tabelle 1

5.2. Auswertung

5.2.1. Histologische Präparate

Das Beobachtungsgut der tabellarischen Übersicht (siehe Anhang) umfaßt die häufig vorkommenden Gliome aus der Gruppe der Astrocytome und Glioblastome und enthält demnach die verschiedenen cytologischen Differenzierungsformen dieser Tumoren. Auch die sogenannten "mixed gliomas", die Oligo-Astrocytome, wurden berücksichtigt.

5.2.1.1. Astrocytome WHO-Grad II

Die hochdifferenzierten Astrocytome, die definitionsgemäß den Astrocytomen mit WHO-Grad II zugeordnet sind, zeigen eine insgesamt so umfangreiche positive GFAP-Reaktion, daß ein klarer Kontrast zu der sehr spärlichen Reaktion bei den höher malignen Astrocytomen und Glioblastomen gegeben ist. Sie lassen aber bereits das Grundproblem der Auswertung erkennen: wenn auch die meisten Tumoren dieser Gruppe in überwiegenden Anteilen eine positive GFAP-Reaktion zeigen, so ist doch in geringem Umfang und in herdförmiger Verteilung das Fehlen einer Reagibilität zu erkennen.

Folgende Beobachtungen führten zu einer Einteilung nach dem Gesamtausmaß der positiven Reaktion auf der einen Seite und der Aufgliederung in reagierende Zellformen auf der anderen Seite: zum einen sind die deutlich positiv reagierenden Zellen in der Gruppe der Astrocytome WHO-Grad II als gefärbte Areale bei mittlerer Vergrößerung zu erkennen. Sie sind nicht homogen über den Tumor verteilt, aber sehr eng und felderförmig gruppiert, und somit ist eine gute quantitative Beurteilung gegeben. Zum anderen können bei hoher Vergrößerung die Formen einzelner reagierender Zellen erfaßt

werden. Da die Astrocyten dieser wenig malignen Astrocytome WHO-Grad II einen hohen cytologischen Differenzierungsgrad aufweisen, gestaltet sich die Auswertung wenig problematisch. Die Tumorzellen entsprechen weitgehend den Differenzierungsformen

1. fibrillärer,
2. protoplasmatischer und
3. gemistocytischer Astrocyten.

Eine Möglichkeit der Untergliederung der Tumorzellen ist dadurch gegeben, daß gerade durch die GFAP-Reaktion die Pilembildung, d.h. die Faserbildung der Tumorzellen sichtbar wird. So ist ein Äquivalentbild zu den Darstellungen mit Versilberungstechniken gegeben, insbesondere mit dem Vorteil, daß die lichtmikroskopisch erkennbaren Fortsätze gleichzeitig durch ihren Gehalt an intrazellulären Fibrillen die Expression von Intermediärfilamenten zeigen. Bei Tumoren, die überwiegend Pilembildung erkennen lassen, werden nur die Tumorzellen mit deutlich abgekugelten Perikaryen von relativ kleiner Größe als protoplasmatisch klassifiziert, während die größeren Zellen mit spärlichen Zellfortsätzen bei sonst umfangreicher Pilembildung im Tumorgewebe zusammen mit einem gemistocytischen Erscheinungsbild dem gemistocytischen Typ zugeordnet werden. Ebenso läßt sich auch zwischen relativ kleinen, polymorph gigantozellulären Zellformen eine Unterscheidung gegenüber relativ kleineren, anscheinend wenig differenzierten gemistocytischen Zellen treffen. Rundliche Zellen mit positiver Reaktion, die nur auf die Perikaryen beschränkt bleibt, werden als oligodendrocyten-ähnliche, bei unregelmäßiger Form als undifferenzierte Zellen aufgeführt, wenn nach dem vorliegenden Schema keine Zuordnung der Tumorzellen zu den bekannten Differenzierungstypen möglich ist. (Abb. 1)

Die Astrocytome mit dem Malignitätsgrad II lassen quanti-

tativ eine sehr hohe Reagibilität gegenüber GFAP erkennen. "Quantitativ umfangreich" hat die Bedeutung, daß viele Tumoreareale mit intensiver Reaktion erfaßt werden können, daneben aber in geringem Umfang auch kleine Bezirke ohne positive Reaktion auftreten. Daher kann nicht von einer vollständigen immunhistologisch positiven Darstellung dieser Tumoren gesprochen werden, sondern nur von einer quantitativ umfangreichen.

Die Reaktion mit S-100-Protein ist in wesentlich geringerem Umfang positiv ausgeprägt. Für sich allein genommen ergibt die sichtbare Reaktion kein einheitliches Bild, da die positiv reagierenden Tumoreareale durchgehend weniger als 50% des untersuchten Tumorgewebes ausmachen. Im Gegensatz zu GFAP, das als Strukturprotein einen stabilen Bestandteil in Form von Zellorganellen darstellt, wird S-100 im Perikaryon gebildet und weitgehend aus der Zelle ausgeschleust. Im Interzellularraum wird es offensichtlich nicht sofort abtransportiert oder weitermetabolisiert, so daß bei einer positiven Reaktion neben dem Nachweis im Perikaryon auch eine diffuse Anfärbbarkeit im Gewebe zu erkennen ist.

Die S-100-positiv reagierenden Zellen treten meist sporadisch, nicht regelmäßig über den Tumor verteilt auf und erscheinen nur ausnahmsweise zu Feldern gruppiert. Daneben zeichnet die S-100-Reaktion nur in Einzelfällen ein Zellbild so exakt wie die GFAP-Reaktion nach, so daß in den meisten Fällen ein wenig prägnantes Bild entsteht und sich keine sichere Beziehung zwischen der Expression von S-100 und dem cytologischen Typ der astrocytären Tumorzelle darstellen läßt.

Im Ganzen gesehen ergibt sich eine Korrelation der positiven Reaktionen in der Art, daß Astrocytome WHO-Grad II 60-80% GFAP-positiv sind und die S-100-Reaktion maximal 20% der GFAP-Reaktion beträgt.

Auf Grund der außerordentlich hohen Reaktionsbereitschaft der Astrocytome WHO-Grad II gegenüber GFAP entsteht ein guter Kontrast zu den sogenannten "mixed gliomas", da sich astrocytäre Tumorzellen von oligodendrocytären Zellen (nicht immer mit einem deutlichen perinukleären Halo, dem "Honeycomb"-Muster, erkennbar) abheben.

5.2.1.2. Astrocytome WHO-Grad III

Die Astrocytome WHO-Grad III erscheinen nicht im gleichen Maß als einheitliche Gruppe wie die Astrocytome WHO-Grad II.

Sie weisen als wesentliche Bestandteile undifferenzierte Tumoranteile auf, daneben aber gleichzeitig auch hochdifferenzierte Areale. Dieser Sachverhalt entspricht dem Malignitätsgrad III der WHO-Klassifikation.

Die genannte Zusammensetzung der Tumoren impliziert, daß die hochdifferenzierten Anteile ein Reaktionsmuster gegenüber GFAP und S-100-Protein analog den Astrocytomen WHO-Grad II zeigen, die undifferenzierten Anteile ein den Tumoren vom WHO-Grad IV entsprechendes Ergebnis aufweisen (Abb. 2).

5.2.1.3. Glioblastome

Eine andere Situation ergibt sich in der Gruppe der Glioblastome, in der nicht zuletzt auch die maximal anaplastischen Astrocytome aufgehen. Als maximal undifferenzierte Astrocytome werden solche Tumoren eingeordnet, die neben den glioblastomartigen Strukturen auch Tumoranteile mit partiell erkennbarer astrocytärer Differenzierung aufweisen.

Während nach der üblichen histologischen Klassifizierung eine Unterscheidung zwischen Glioblastom und undifferenziertem Astrocytom getroffen werden kann (1, 51, 60), ist in der GFAP-Reaktion kein deutlicher Unterschied erkennbar.

Diese Tumoren sind nach den vorliegenden Befunden und unter Berücksichtigung der Literaturangaben (38) dadurch charakterisiert, daß nur in wenigen Zellgruppen oder einzelnen Zellen GFAP exprimiert wird. Unter den GFAP-positiv reagierenden Zellen sind die bekannten astrocytären Zellformen ebenso vertreten wie nicht einzuordnende undifferenzierte Zellen. Das Reaktionsmuster erscheint in hohem Maß uneinheitlich, da alle Zellübergänge zwischen kleinen und monströsen Formen zu erkennen sind und sowohl kleine, als auch gemistocyten-ähnliche oder riesenhafte Tumorzellen in regelloser Verteilung vereinzelt GFAP-positiv, meistens aber negativ sind. Die einzelnen Zellen mit positiver Reaktion repräsentieren jedoch keinen einheitlichen Zelltyp, der dazu verwandt werden könnte, diesen maximal anaplastischen Gliomen die Prädominanz einer Zelldifferenzierung und/oder Zellart zuzuschreiben. Quantitativ spielt die positive Reaktion von Zellgruppen oder Einzelzellen deshalb keine Rolle, weil der Umfang von Minimalreaktionen nicht überschritten wird.

S-100-Protein hinterläßt in der Gruppe der Glioblastome derartig geringe Reaktionsspuren, daß weder eine mengenmäßig relevante Erfassung, noch eine Diskussion dieses geringfügigen Befundes sinnvoll erscheint (Abb. 3).

Auffällig ist die Markierung des sogenannten gigantozellulären Glioblastoms.

Im Untersuchungsgut sind diese Tumoren an ihrem ausgesprochen biphasischem Zellbild zu erkennen, mit sowohl riesenhaften polymorphen Tumorzellen als auch Subpopulationen aus Zellen mit relativ kleinen lymphozytenartigen Zellkernen. Sie zeigen ein unberechenbares immunhistochemisches Verhalten gegenüber GFAP und S-100-Protein, indem vom Erscheinungsbild bei konventioneller Färbung her vergleichbare Tumoren ebensogut insgesamt negativ wie positiv, wie auch in sich teils positiv, teils negativ waren (Abb. 4).

5.2.2. Zellkulturen

Von 16 der untersuchten Tumoren wurden Zellkulturen angelegt, die oft über mehrere Passagen propagiert werden konnten.

Obgleich in dieser Gruppe die ganze Variationsbreite der Astrocytome und Glioblastome mit hoch- bzw. niedrigdifferenzierten polymorphzelligen Tumoren vertreten ist, kommt dem Untersuchungsergebnis mit Rücksicht auf den Umfang des Materials nur bedingte Aussagekraft zu.

Ausgewählte Zellkulturen verschiedener Passagen wurden fixiert und mit der Immunperoxidase-Reaktion gefärbt.

Eine Reaktion mit GFAP zeigt sich in den meisten frühen Passagen, wobei deutlich angefärbte, zum Teil netzartige Strukturen in den fibrillenreichen langgestreckten Zellen zu erkennen sind. Im Kontrast dazu weisen die nicht markierbaren Zellkulturen nur einzelne oder überhaupt keine sichtbar reagierenden Zellen auf. Bei den GFAP-negativen Elementen handelt es sich zum einen um besonders kleine und schmale Zellen, zum anderen um große, flach einem Substrat anhaftende Zellformen, die nur kurze, plumpe Fortsätze bilden. Es ist aufgrund der deutlich erkennbaren Reagibilität der Zellen in Kultur möglich, für die GFAP-Reaktion positiv gegen negativ zu kontrastieren. (Abb. 5)

Die Reaktion mit S-100-Protein ist nicht in derselben Weise prägnant, da keine Zellstrukturen markiert werden, sondern nur eine zum Teil diffuse Anfärbbarkeit des Perikaryons erkennbar ist. In Parallelität zum Umfang der Reaktion bei den Tumoren im histologischen Schnitt ist S-100 in einem geringeren Ausmaß als GFAP nachweisbar.

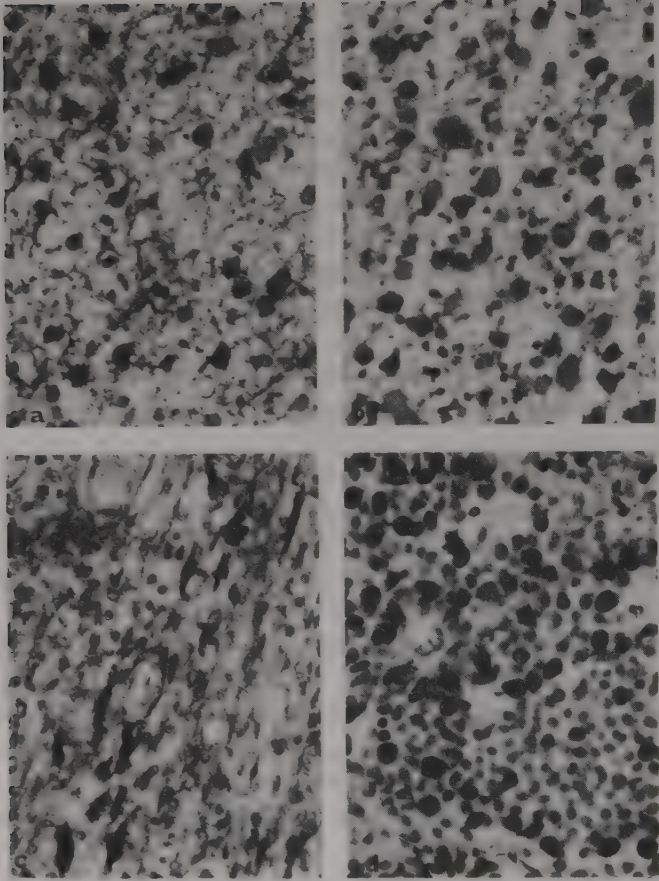


Abb. 1: Zelldifferenzierungen mit GFAP-positiver Reaktion:
a - fibrilläre Astrocyten (Tab. 1, Nr. 6)
b - gemistocytische Astrocyten (Tab. 1, Nr. 48)
c - fusiforme Zellen (Tab. 1, Nr. 104)
d - oligodendrocyten-ähnliche Zellen (Tab. 1, Nr. 127)
(Indirekte Immunperoxidase-Technik, x 250)

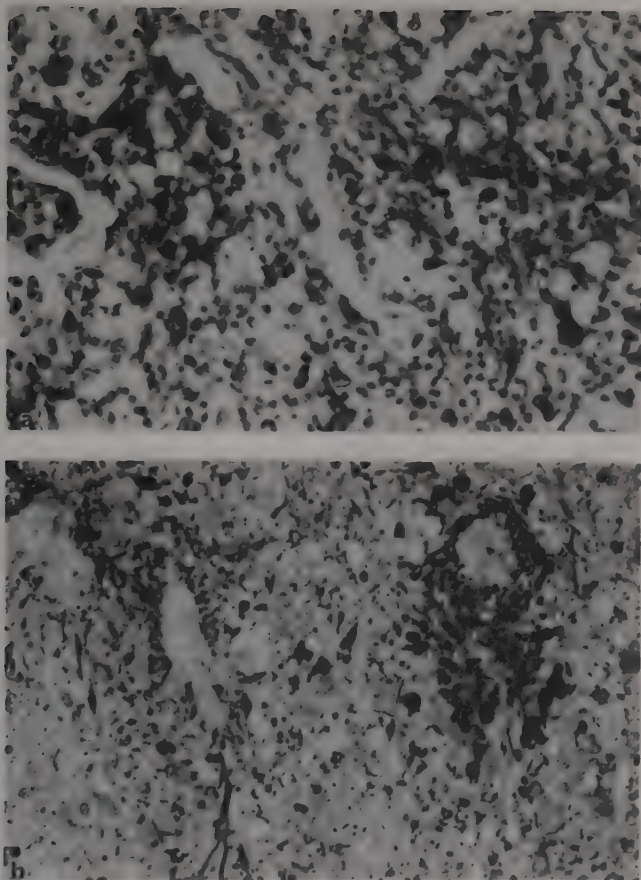


Abb. 2: a - Glioblastom (Tab. 1, Nr. 96) mit uneinheitlichem Reaktionsmuster bei der GFAP-Darstellung: bunte Mischung unterschiedlich stark reagierender Tumorzellen.

b - Astrocytom WHO-Grad III (Tab. 1, Nr. 39): GFAP-positiv reagierende Tumorzellgruppe (entsprechend Astrocytom WHO-Grad II) innerhalb nichtmarkierten Tumorgewebes.

(Indirekte Immunperoxidase-Technik, x 250)

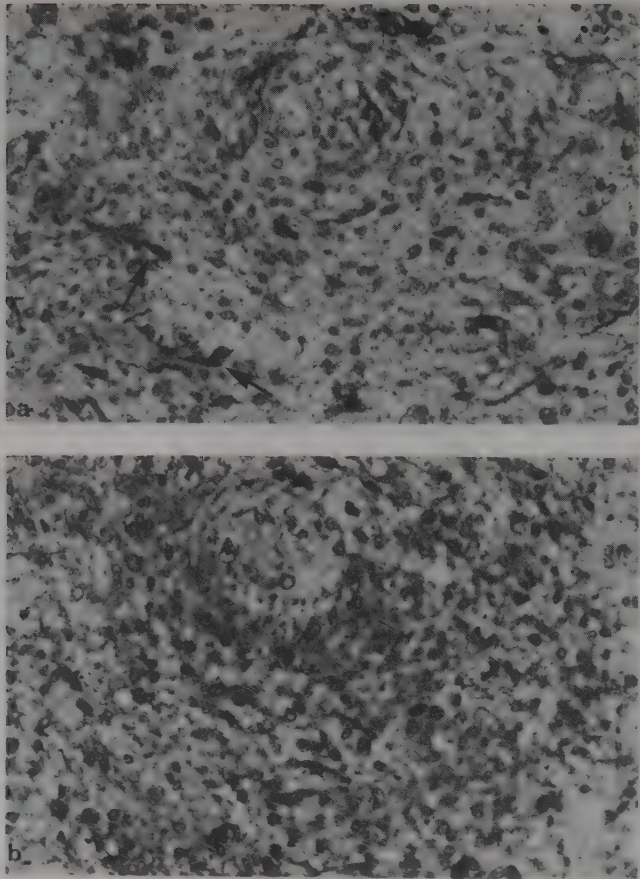


Abb. 3: Vergleichende Darstellung von GFAP und S-100 in einem Glioblastom (Tab. 1, Nr. 107):
a - deutliche Markierung einzelner Tumorzellen beim Nachweis von GFAP (←).
b - diffuse Anfärbung im Gewebe neben schwach positiver Reaktion einzelner Tumorzellen beim Nachweis von S-100.
(Indirekte Immunperoxidase-Technik, x 250)

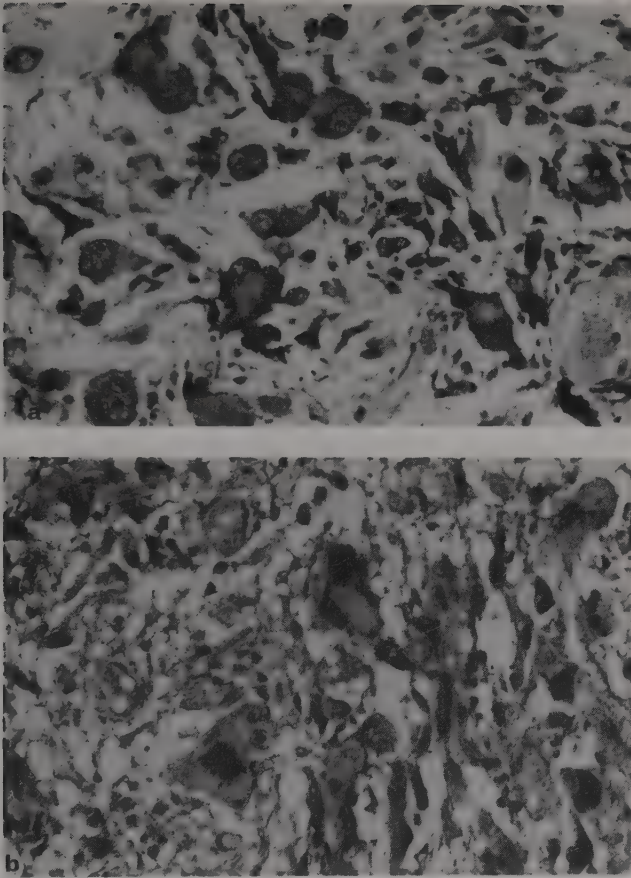


Abb. 4: Gigantozelluläres Glioblastom (Tab. 1, Nr. 100):
a - GFAP-positiv reagierende polymorphe Tumorzellen.
b - Tumorzellen ohne erkennbare Reaktion.
(Indirekte Immunperoxidase-Technik, x 250)

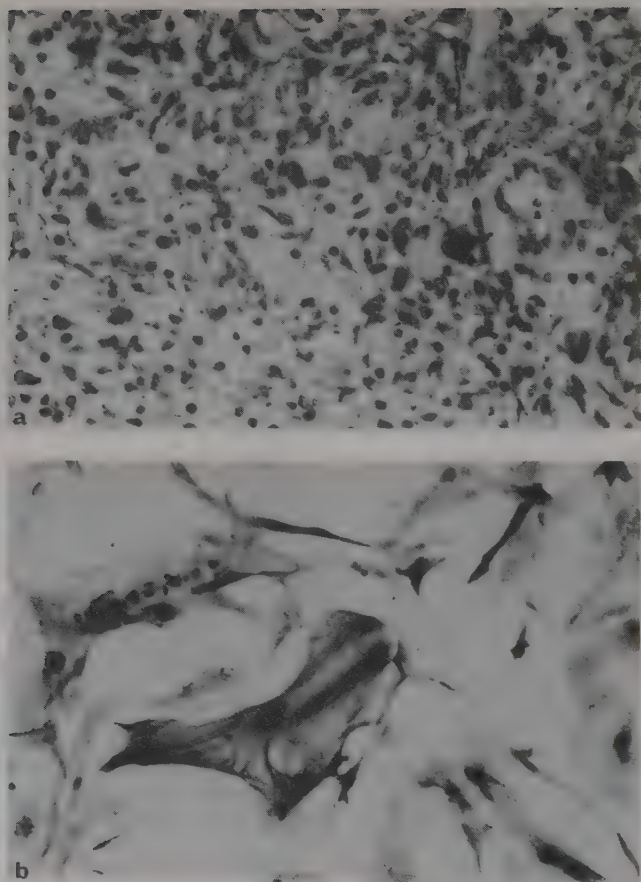


Abb. 5: GFAP-Darstellung in einem Astrocytom WHO-Grad III (Tab. 1, Nr. 77) und der daraus etablierten Kultur:
a - positive Reaktion einzelner Tumorzellen vom fibrillären Typ im Tumorgewebe.
b - Tumorzellen mit deutlich angefärbten netzartigen Cytoplasmastrukturen in der Zellkultur.
(Indirekte Immunperoxidase-Technik, a x 250, b x 100)

6. Diskussion

6.1. GFAP-Reaktion

Bei den Astrocytomen WHO-Grad II läßt sich nach den üblichen lichtmikroskopisch erkennbaren morphologischen Kriterien des Hämatoxylin-Eosin-Schnittes insofern eine gute Vorhersage in Bezug auf die erwartete GFAP-Reaktion treffen, als diese hochdifferenzierten Gliome in besonders großem Umfang felderförmig dicht gruppierte, GFAP-positiv reagierende Tumorzellen aufweisen. Wenn auch dieses Ergebnis der Vorstellung entspricht, daß ein faserreicher Astrocyt eines fibrillären Astrocytoms auch intrazellulär viel Intermediärfilament besitzt, so zeigt doch ein großer Teil der fibrillären Astrocyten trotz ausgiebiger Fortsatzbildung physiologischerweise kein Intermediärfilament.

Im Gegensatz zu der zu erwartenden Reagibilität bei Astrocytomen WHO-Grad II ist bei den Glioblastomen keine realistische Vorhersage bezüglich der Immunreaktion möglich.

Etwa 80% aller positiv darstellbaren Tumorzellen entsprechen in ihrem Erscheinungsbild den Zelltypen, die zur Grundlage der Tumorklassifikation herangezogen worden waren (fibrillär, protoplasmatisch, gemistocytisch, gigantozellulär). Daneben muß aber der Anteil an offensichtlich positiv reagierenden Zellen mit anderer Differenzierung betrachtet werden:

1. Tumorzellen, die lichtmikroskopisch mit ihren aufgehellten Perikaryen der Vorstellung eines Oligodendrocyten entsprechen, sind in einigen Fällen GFAP-positiv. Ihre Gruppenbildung läßt die Deutung als Anschnitte von Tumorzellen mit astrocyten-ähnlicher Pilembildung nicht zu.
2. Tumorzellen mit relativ kleinen, langgestreckten hyper-

chromatischen Kernen und besonders elongiertem Zelleib mit nur sehr spärlicher Pilembildung, ähnlich den sogenannten "fusiformen" Tumorzellen, sind in einigen Tumorexemplaren in größeren Gruppen GFAP-positiv. Bemerkenswert ist ihr Auftreten in Tumoren der Malignitätsgruppe WHO-Grad III, also im Zusammenhang mit anscheinend höherer Tumordifferenzierung als bei den Glioblastomen, in denen diese nur in Einzelexemplaren positiv markierbar sind. Sie werden als "fusiforme" Zellen berücksichtigt und selbständig erfaßt, wobei ihre eventuelle Herkunft von üblichen Astrocyten unklar bleibt.

3. Tumorzellen mit positiver Reaktion in undifferenten Tumorfeldern werden als undifferent bezeichnet, wenn ihre polymorphen Zellkerne und ihre bizarr geformten, faserarmen Cytoplasmaausläufer keine Ähnlichkeit zu den bekannten Astrocytenformen oder den oben erwähnten oligodendrocyten-ähnlichen oder "fusiformen" Zellen aufweisen.

Das auffallendste Ergebnis der Auswertung ist die erkennbare Diskrepanz zwischen dem Umfang der positiven GFAP-Reaktion bei den niedrig malignen Tumoren und dem beinahe fehlenden Reaktionsprodukt bei den Gliomen höherer Malignität.

Dieser Befund stimmt mit den Aussagen in der Literatur überein (10, 18, 19, 21, 28, 29, 37, 38, 43, 58, 68, 69, 70).

Das deutliche Reaktionsgefälle ist jedoch nicht als Regel anzusehen, da einzelne Tumoren aus der Gruppe der fibrillären Astrocytome WHO-Grad II eine spärliche Reaktionsbereitschaft zeigen, während einige wenige Exemplare aus der Gruppe der Glioblastome deutlich positiv reagierende Tumorfelder aufweisen.

Die dargestellten Befunde zeigen dementsprechend einige Ungereimtheiten. Es beginnt bei der Bewertung der Tatsache,

daß bei den fibrillären Astrocytomen WHO-Grad II zwar sicherlich der größte Teil der Tumorzellen mittels der Reaktion auf GFAP darzustellen ist, ein nicht zu negierender Anteil des Gewebes jedoch keine Reagibilität zeigt. Es ist anzunehmen, daß dieses Ergebnis mit dem bereits beschriebenen Phänomen zusammenhängt, daß auch im Normalgewebe der fortsatzreiche Astrocyt nur zu einem geringen Teil Intermediärfilamente (und entsprechend GFAP) besitzt.

Nur die Zellgruppe der reaktiven Astrocyten, die zur Vorstellungsbildung und Veranschaulichung des Begriffes des faserreichen Astrocyten herangezogen werden, entspricht der Vorstellung, daß fast alle Zellen ein Cytoskelett aus Intermediärfilamentprotein besitzen. Es ist auch in der Literatur zu erkennen, daß gerade die reaktiven Astrocyten als Demonstrationsobjekt für die Spezifität der GFAP-Reaktion und die Prägnanz dieser Methode herangezogen wurden (21, 22, 23, 68).

In jedem Fall ist der Begriff des fibrillären Astrocyten nicht identisch mit der Vorstellung des fibrillenreichen Astrocyten, der zwar viele Zellfortsätze aufweist, aber in diesen Fortsätzen nicht unbedingt in größerem Umfang Intermediärfilamente (= Fibrillen) bzw. Intermediärfilamentprotein (= GFAP) entwickelt. Dieser Sachverhalt ist zwar bemerkenswert, aber derzeit keiner eindeutigen Interpretation zugänglich.

Aus den genannten Gründen erscheint es also nicht sinnvoll, "fibrilläre" Astrocytome gleichzusetzen mit Astrocytomen bestehend aus fortsatzreichen Astrocyten mit reichlich GFAP. Überraschender als diese Tatsache ist, daß unter den nicht fibrillären Astrocytenformen, den protoplasmatischen, gemistocytischen und oligodendrocytären Tumorzellen ebenfalls positive GFAP-Reaktionen auftreten. Ebenso unerwartet sind in einzelnen Tumoren unter den protoplasmatischen Tumorzellen neben nur geringfügiger GFAP-positiver Reaktion

auch felderförmig gruppierte, deutlich positiv dargestellte protoplasmatische Astrocyten zu erkennen.

Die Frage, inwieweit gemistocytische Astrocyten auch in größerem Umfang Intermediärfilamente besitzen, wird schon seit längerer Zeit diskutiert (21, 28). In der vorliegenden Untersuchungsreihe ist gerade unter den gemistocytischen Astrocytomen eine größere Zahl, die eine beinahe das gesamte Tumorgewebe betreffende positive Reagibilität zeigen (Abb. 1 b). Zusätzlich zu der Darstellung der sehr umfangreichen Perikaryen, die als charakteristisches Merkmal der Gemistocysten anzusehen sind, wird auch eine deutliche Pilembildung sichtbar. Es erscheint durchaus möglich, daß bei der Begriffsbildung und der Definition des gemistocytischen Astrocyten und in seiner Abgrenzung vom fibrillären Astrocyten das Ausmaß der Zellfortsatzbildung (identisch mit dem Begriff der Pilembildung) unterschätzt worden ist.

Die Tatsache, daß mittels der GFAP-Reaktion die Pilembildung im Gewebe überraschend deutlich dargestellt werden kann, zeigt die Möglichkeit auf, diese bekannten Tumorzellenformen mit einer erweiterten Charakteristik zu beschreiben, je nachdem ob sie viel oder wenig Intermediärfilament exprimieren.

Ein anderes Problem ergibt sich in der Beurteilung der sogenannten "fusiformen", also klein- und spindelförmigen Tumorzellen.

Dieser Zelltyp ist nicht unter allen Umständen als eine eigene Zellform zu erkennen, sondern besitzt wahrscheinlich nur in durchweg fusiform aufgebauten Tumoren eine eigene Identität. Das Reaktionsverhalten dieser Zellen wurde nur in diesen anscheinend monomorphen fusiformen Tumoren beurteilt, da in diesen Fällen ihre Reagibilität immerhin in einem geringen Umfang gegeben ist (Abb. 1 c). Es lassen sich jedoch keine weiteren Beziehungen zu Zelldifferenzierungen der Astrocyten herstellen, und so muß dahingestellt bleiben,

ob es sich um eine hochdifferenzierte, relativ kleinzellige Astrocytenform, um eine GFAP-positive undifferenzierte Tumorzelle, oder um eine in Entwicklung befindliche astrocytenartigen Zelle handelt. Schließlich ist noch die Möglichkeit zu berücksichtigen, daß es sich hier um eine Zelle des MPS (Mononukleäres Phagozytensystem) handeln könnte, also nicht um einen originären Bestandteil des Hirngewebes, sondern um einen eingewanderten Makrophagen.

In einigen der untersuchten Tumoren sind Areale zu erkennen, in denen alle Zellen oligodendrocyten-ähnlich sind. In diesen Fällen ist es wenig wahrscheinlich, daß dieses oligodendrocytenartige Bild durch Anschnitte von anderen, anaplastischen oder polymorphen Tumorzellen entsteht. So gibt es in zwar geringem, aber dennoch wertbarem Umfang Tumorzellen von oligodendrocyten-ähnlichem Erscheinungsbild mit positiver GFAP-Reaktion (Abb. 1 d).

In diesem Zusammenhang sind die Befunde aus der Gewebekultur heranzuziehen, die gegen eine strikte Unterteilung der Makroglia in "nur Astrocyten" gegen "nur Oligodendroglia" sprechen (25). Diese Zellformen sind dadurch definiert, daß sie bei der Untersuchung des Rückenmarks oder der Großhirnhemisphären gefunden wurden. In diese Betrachtung ist noch nicht eingegangen, daß es ZNS-Strukturen gibt, die durchaus regional eine weitergehende Differenzierung aufweisen (57).

Unter diesem Aspekt können die Ergebnisse aus der Gewebekultur gewertet werden. In vitro treten nämlich neben den bekannten astrocytären, fibrillenreichen und GFAP-positiven Zellen auch schwer einzuordnende Zellelemente auf, die zum Teil in der Literatur als Intermediärformen beschrieben werden (25). Ein Argument für diese Überlegungen ist u.a. die Tatsache, daß zum einen unter den normalen Astrocyten nur ein großer Prozentsatz und nicht die Gesamtheit Gliafaserprotein aufweist und zum anderen das Gliafaserprotein

kein "Zellmarker", sondern ein Intermediärfilament aus der Gruppe der Cytoskelettelemente ist. Dieses Cytoskelett charakterisiert allerdings Zellreihen und nicht nur ein Zellindividuum.

Hierdurch ist aber noch nicht entschieden, inwieweit es sich bei diesen Zellen um eine Differenzierungsform oder um eine Vorstufe eines Astrocyten handelt. Aus anatomischen und histogenetischen Studien ist belegt, daß eine Vorläuferzelle eines Astrocyten oligodendrocytär aussehen kann (15, 57, 61). Daher ist es nicht möglich, Zellen als anaplastisch zu bezeichnen, die zwar noch nicht als Astrocyten oder Oligodendrocyten zu identifizieren sind, aber unmittelbar vor ihrer weiteren Ausformung stehen. Aus diesem Grund ist seit langem der Begriff der indifferenten Gliazelle eingeführt (57). Es läßt sich aber nicht nachvollziehen, inwieweit der aus der Gewebezüchtung stammende Begriff des "Intermediärtypus" identisch mit dem bereits eingeführten Begriff der indifferenten Gliazelle ist oder einen Differenzierungsverlust ausdrückt.

Als Erklärung für die positive Reaktion einiger Zellen innerhalb der Glioblastome ist möglicherweise aus dem Gewebezusammenhang zu schließen, daß ein Teil der polymorphen und undifferenzierten Tumorzellen, ob sie nun wenig differenzierte besonders kleine, oder wenig differenzierte sehr große Zellindividuen darstellen, ihre positive Reaktion aus einem Differenzierungsrest ableiten. Schwieriger ist die Deutung von polymorphen oder undifferenzierten Tumorzellen, die nur in Einzelexemplaren sichtbar werden, ohne daß größere Gewebsareale positiv reagieren. Bei diesen Tumorzellen kann die in der Literatur (26, 36) vertretene Meinung geltend gemacht werden, daß bei den hochmalignen Tumoren im Gegensatz zu den wenig malignen die genetische Codierung unter Umständen nicht mehr stabil sein kann. Für diesen Fall ist der positive Reaktionsnachweis in einzelnen Tumor-

zellen nicht unbedingt als Beweis für die histogenetische Ableitung des Tumors zu werten, sondern könnte auch auf eine zellbiologisch atypische Expression infolge genetischer Instabilität zurückzuführen sein.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß eine Beziehung zwischen der Häufigkeit der GFAP-positiven Reaktionen und den astrocytären Tumordifferenzierungen der Gliome niedriger Malignität hergestellt werden kann. Das von Fall zu Fall negative Resultat der GFAP-Reaktion läßt auf eine polyclonale Zusammensetzung dieser Tumoren schließen.

6.2. S-100-Reaktion

Wenn man die Ergebnisse der Auswertung zusammenfaßt, ist S-100 im Gegensatz zu GFAP nur in relativ geringem Umfang mit Hilfe der Immunperoxidase-Techniken am Paraffinmaterial nachweisbar.

Das Auftreten von S-100 im Perikaryon ist gut zu beurteilen, wenn es auch zum Teil nur spärlich vorhanden ist.

Da S-100 bekanntlich kein Strukturprotein ist, sondern größtenteils als lösliches Produkt frei in der Zelle auftritt, besteht die Möglichkeit, daß der größte Teil des Proteins aus der Zelle ausgeschleust ist. Falls dieses Protein zum Zeitpunkt der Untersuchung noch diffus im Tumorgewebsverband verteilt vorliegt, ist es markierbar. Da keinerlei Kenntnis über die biologische Halbwertszeit des Proteins nach der Abgabe in den Interzellularraum besteht, kann in der Beurteilung nur der wesentliche, intracytoplasmatisch befindliche Anteil gewertet werden.

Unter Zugrundelegung der unbefriedigenden immunocytochemischen Ergebnisse beim Nachweis des S-100-Antigens im Paraffinmaterial kann angenommen werden, daß die Antigenität

dieses Proteins durch den Fixations- bzw. Einbettungsvorgang beeinträchtigt wird. Für diese Annahme sprechen auch die bei der Darstellung von S-100-Protein mit Hilfe der Immunfluoreszenz am nativen Material erhobenen Befunde (31, 32, 71).

7. Zusammenfassung

1. Die historische Entwicklung der Gliazell- und Gliatumor-klassifikation, sowie der derzeitige Stand des immun-histochemischen Nachweises von GFAP ("glial fibrillary acidic protein") und S-100-Protein als glia-assoziierte Antigene wird dargestellt.
2. Die Untersuchung der GFAP- und S-100-Expression im Gewebe von 143 Astrocytomen und Glioblastomen ergibt, daß
 - a) bei Astrocytomen der Malignitätsstufe WHO-Grad II die Reaktion auf GFAP und S-100-Protein verhältnismäßig einheitlich positiv ist,
 - b) bei Glioblastomen die Expression beider Proteine weitgehend blockiert ist, und
 - c) bei Astrocytomen der Malignitätsstufe WHO-Grad III in herdförmiger Verteilung den Astrocytomen WHO-Grad II und Glioblastomen vergleichbare Befunde vorliegen.
3. Die Darstellung von GFAP in Paraffinmaterial hat in diagnostischer Hinsicht deutlich höhere Aussagekraft als die von S-100-Protein.
4. Die in Zellkulturen von Tumorgewebe erhobenen Befunde entsprechen im wesentlichen denen im originären Tumorgewebe.
5. Die beobachteten Verteilungsmuster positiver Zellreaktionen sowohl im Tumorgewebe als auch in den daraus angelegten Kulturen sprechen für eine polyklonale Herkunft der Tumorzellpopulationen.

8. Summary

Immunohistochemical demonstration of glial associated
antigens in astrocytomas and glioblastomas
and in their cultures

1. The historical development of anatomical classification of glial cells and of classification of glial cell tumors is reviewed together with the present state of immunohistochemical demonstration of GFA- and of S-100-protein as specific proteins.
2. Determination of GFAP and S-100 antigen expression in the tissues of 143 human astrocytomas and glioblastomas shows that
 - a) in astrocytomas corresponding to WHO grade II, reaction with antisera against GFAP and S-100 antigen is rather uniformly positive,
 - b) in glioblastomas corresponding to WHO grade IV, expression of both proteins is blocked to a wide extent,
 - c) in astrocytomas corresponding to WHO grade III, findings correspond to either astrocytomas grade II or glioblastomas in a focally dispersed distribution.
3. Expression of GFAP carries distinctly higher significance than expression of S-100 protein.
4. Findings in cultured tumor cells correspond essentially to those in the original tumor tissue.

5. The patterns of distribution of positive cellular reaction in tumor tissue as well as in cultures established from tumor tissue suggest polyclonal origin of tumor cell populations.
-

Mit finanzieller Unterstützung der Wilhelm Sander-Stiftung (Sta - 86.005.1) und des C. Bohneward-Fonds für Krebsforschung, Universität München, durchgeführt.

9. Literatur

- (1) ACKERMAN, L.V., ROSAI, J.:
Surgical Pathology.
The C. V. Mosby Company, St. Louis 1974
- (2) ALBRECHTSEN, M., VON GERSTENBERG, A.C., BOCK, E.:
Mouse Monoclonal Antibodies Reacting with Human Brain
Glial Fibrillary Acidic Protein.
J. Neurochem. 42: 86-93, 1984
- (3) BAILEY, P.:
Die Hirngeschwülste. 2. Auflage, Kap. 10, 12, 14.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1951
- (4) BAILEY, P.:
Cellular Types of Gliomatous Tumors.
In: Cytology & Cellular Pathology of the Nervous
System. Bd. 3, Kap. XVIII., Hrsg. W. Penfield.
Hafner Publishing Company, New York 1965
- (5) BAUDIER, J., BRIVING, C., DEINUM, J., HAGLID, K.,
SÖRSKOG, L., WALLIN, M.:
Effect of S-100 Proteins and Calmodulin on Ca^{2+} -induced
Disassembly of Brain Microtubule Proteins in Vitro.
FEBS Lett. 147: 165-167, 1982
- (6) BAUDIER, J., MANDEL, P., GERARD, D.:
Bovine Brain S100 Proteins: Separation and
Characterization of a New S100 Protein Species.
J. Neurochem. 40: 145-152, 1983

- (7) BENDA, P., SOMEDA, K., MESSER, J., SWEET, W.H.:
Morphological and Immunochemical Studies of Rat Glial
Tumors and Clonal Strains Propagated in Culture.
J. Neurosurg. 34: 310-323, 1971

- (8) BIGBEE, J.W., BIGNER, D.D., PEGRAM, C., ENG, L.F.:
Study of Glial Fibrillary Acidic Protein in a Human
Glioma Cell Line Grown in Culture and as a Solid Tumor.
J. Neurochem. 40: 460-467, 1983

- (9) BLACKWOOD, W., DODDS, T.C., SOMMERVILLE, J.C.:
Section X: Tumours.
In: Atlas of Neuropathology. 2. Auflage.
E. & S. Livingstone LTD, Edinburgh and London 1964

- (10) BONNIN, J.M., RUBINSTEIN, L.J.:
Immunohistochemistry of Central Nervous System Tumors.
J. Neurosurg. 60: 1121-1133, 1984

- (11) BOURNE, J.A.:
Handbook of Immunoperoxidase Staining Methods.
Immunocytochemistry Laboratory, Dako Corporation 1983

- (12) BURGER, P.C., VOGEL, F.S.:
Kap. 4: The Brain-Tumors.
In: Surgical Pathology of the Nervous System and Its
Coverings.
John Wiley & Sons, New York 1976

- (13) CAIRNCROSS, J.G., MATTES, M.J., BERESFORD, H.R.,
ALBINO, A.P., HOUGHTON, A.N., LLOYD, K.O., OLD, L.J.:
Cell Surface Antigens of Human Astrocytoma Defined by
Mouse Monoclonal Antibodies: Identification of
Astrocytoma Subsets.
Proc. Natl. cad. Sci. USA 79: 5641-5645, 1982

- (14) CHEN, T.T., MEALEY, J., CAMPBELL, R.L.:
Quantitative Cloning of Malignant Human Glioma Cells by
Conditioned Medium.
J. Natl. Cancer Inst. 55: 1275-1280, 1975
- (15) CHOI, B.H., KIM, R.C.:
Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein in
Immature Oligodendroglia.
Science 223: 407-409, 1984
- (16) COLLINS, V.P.:
Monoclonal Antibodies to Glial Fibrillary Acidic
Protein in the Cytologic Diagnosis of Brain Tumors.
Acta Cytol. 28: 401-406, 1984
- (17) COLLINS, V.P., MOSER, R.:
Monoclonal Antibodies to Glial Fibrillary Acidic
Protein.
Acta path. microbiol. immunol. scand. Sect. A, 91:
269-279, 1983
- (18) DAVIS, R.L.:
Astrocytomas.
In: Pathology of the Nervous System, Band 2, Kap. 153.
Hrsg. J. Minckler.
McGraw-Hill Book Company, New York 1971
- (19) DELPECH, B., DELPECH, A., VIDARD, M.N., GIRARD, N.,
TAYOT, J., CLEMENT, J.C., CREISSARD, P.:
Glial Fibrillary Acidic Protein in Tumours of the
Nervous System.
Br. J. Cancer 37: 33-40, 1978

- (20) DONATO, R., ISOBE, T., OKUYAMA, T.:
S-100 Proteins and Microtubules: Analysis of the Effects of Rat Brain S-100 (S-100b) and Ox Brain S-100a₀, S-100a and S100b on Microtubule Assembly-Disassembly.
FEBS Lett. 186: 65-69, 1985
- (21) DUFFY, P.E.:
Astrocytes: Normal, Reactive, and Neoplastic.
Raven Press, New York 1983
- (22) DUFFY, P.E., GRAF, L., HUANG, Y.-Y., RAPPORT, M.M.:
Glial Fibrillary Acidic Protein in Ependymomas and Other Brain Tumors.
J. Neurol. Sci. 40: 133-146, 1979
- (23) ENG, L.F.:
The Glial Fibrillary Acidic Protein: The Major Protein Constituent of Glial Filaments.
Scand. J. Immunol. 15, Suppl. 9: 41-51, 1982
- (24) FAN, K.:
S-100 Protein Synthesis in Cultured Glioma Cell is G₁-Phase of Cell Cycle Dependent.
Brain Res. 237: 498-503, 1982
- (25) FEDOROFF, S.:
Macroglial Cell Lineages.
In: Molecular Bases of Neural Development, Kap. 5.
Hrsg. G.M. Edelman, W.E. Gall, W.M. Cowan.
John Wiley & Sons, New York 1985

- (26) FROST, P., KERBEL, R.S.:
On a Possible Epigenetic Mechanism(s) of Tumor Cell
Heterogeneity.
Cancer Metast. Rev. 2: 375-378, 1983
- (27) GHEUENS, J., DE SCHUTTER, E., NOPPE, M., LOWENTHAL, A.:
Identification of Several Forms of the Glial Fibrillary
Acidic Protein, or a-Albumin, by a Specific Monoclonal
Antibody.
J. Neurochem. 43: 964-970, 1984
- (28) GOEBEL, H.H., SCHLIE, M., BODE, G., SPOERRI, O., ENG,
L.F.:
Die immunhistologische Darstellung des Gliafaser-
proteins in der neuropathologischen Tumordiagnostik.
Pathologe 3: 164-167, 1982
- (29) GULLOTTA, F., SCHINDLER, F., SCHMUTZLER, R., WEEKS-
SEIFERT, A.:
GFAP in Brain Tumor Diagnosis: Possibilities and
Limitations.
Path. Res. Pract. 180: 54-60, 1985
- (30) HAAN, E.A., BOSS, B.D., COWAN, W.M.:
Production and Characterization of Monoclonal
Antibodies against the "Brain-specific" Proteins 14-3-2
and S-100.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 7585-7589, 1982
- (31) HAGLID, K., CARLSSON, C.-A., STAVROU, D.:
An Immunological Study of Human Brain Tumors Concerning
the Brain Specific Proteins S-100 and 14.3.2..
Acta neuropathol. (Berl.) 24: 187-196, 1973

- (32) HAGLID, K.G., STAVROU, D.:
Water-soluble and Pentanol-extractable Proteins in
Human Brain Normal Tissue and Human Brain Tumours, with
Special Reference to S-100 Protein.
J. Neurochem. 20: 1523-1532, 1973
- (33) HAYNES, L.W., WELLER, R.O.:
Induction of Some Features of Glial Differentiation in
Primary Cultures of Human Gliomas by Treatment with
Dibutryl Cyclic AMP.
Br. J. exp. Path. 59: 259-276, 1978
- (34) HENSCHEN, F.:
Referat über Gliome.
Verh. Dtsch. Pathol. Ges. 27. Tagg.
Fischer, Jena 1934
- (35) HENSCHEN, F.:
Tumoren des Zentralnervensystems und seiner Hüllen.
In: Handb. spez. path. Anat., Bd XIII/3. Hrsg. W. Scholz.
Springer-Verlag, Berlin Göttingen Heidelberg 1955
- (36) HEPPNER, G.H.:
Tumor Heterogeneity.
Cancer Res. 44: 2259-2265, 1984
- (37) JACQUE, C.M., KUJAS, M., POREAU, A., RAOUL, M.,
COLLIER, P., RACADOT, J., BAUMANN, N.:
GFA and S100 Protein Levels as an Index for Malignancy
in Human Gliomas and Neurinomas.
J. Natl. Cancer Inst. 62: 479-483, 1979

- (38) JACQUE, C.M., VINNER, C., KUJAS, M., RAOUL, M.,
RACADOT, J., BAUMANN, N.A.:
Determination of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)
in Human Brain Tumors.
J. Neurol. Sci. 35: 147-155, 1978
- (39) JÄNISCH, W., GÜTHERT, H., SCHREIBER, D.:
Astrozytome.
In: Pathologie der Tumoren des Zentralnervensystems,
Kap. 3.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1976
- (40) KAHN, H.J., MARKS, A., THOM, H., BAUMAL, R.:
Role of Antibody to S100 Protein in Diagnostic
Pathology.
Am. J. Clin. Pathol. 79: 341-347, 1983
- (41) KERNOHAN, J.W., MABON, R.F., SVIEN, H.J., ADSON, A.W.:
A Simplified Classification of the Gliomas.
Proc. Staff. Meet. Mayo Clinic 24: 71-75, 1949
- (42) KERSTING, G.:
Die Gewebszüchtung menschlicher Hirngeschwülste.
Springer-Verlag, Heidelberg 1961
- (43) KIMURA, T., BUDKA, H., SOLER-FEDERSPIEL, S.:
An Immunocytochemical Comparison of the Glia-associated
Proteins Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) and
S-100 Protein (S100P) in Human Brain Tumors.
Clin. Neuropathol. 5: 21-27, 1986
- (44) KUHLEND AHL, H., MILTZ, H., WÜLLENWEBER, R.:
Die Astrozytome des Großhirns.
Acta Neurochir. 29: 151-162, 1973

- (45) LISS, L.:
The Use of Tissue Cultures in the Study of Brain Tumors.
Progr. exp. Tumor Res. 17: 93-110, 1972
- (46) LUMSDEN, C.E.:
The Study by Tissue Culture of Tumours of the Nervous System.
In: Pathology of Tumours of the Nervous System, 3. Auflage, Kap. 14. Hrsg. D.S. Russel, L.J. Rubinstein. Edward Arnold (Publishers) LTD, London 1971
- (47) LUSE, S.:
Neuroglia.
In: Pathology of The Nervous System, Band 1, Kap. 45. Hrsg. J. Minckler. McGraw-Hill Book Company, New York 1968
- (48) MANUELIDIS, E.E.:
Long-Term Lines of Tissue Cultures of Intracranial Tumors.
J. Neurosurg. 22: 368-373, 1965
- (49) MARKS, A., LAW, J., MAHONY, J.B., BAUMAL, R.:
The Structural Conservation of S100 Protein During Evolution: Analysis by Reaktivty with a Monoclonal Antibody.
J. Neurochem. 41: 107-112, 1983
- (50) MAUNROY, R., COURDI, A., VEDRENNE, C., CONSTANS, C.P.:
Localisation immunocytochimique de la proteine gliofibrillaire dans les heterogreffes de cultures de gliomes humains.
Neurochirurgie 24: 221-226, 1978

- (51) MCMENEMEY, W.H.:
Tumours of the Central Nervous System.
In: Systemic Pathology, 2. Aufl., Band 5, Kap. 34.
Hrsg. W.St C. Symmers.
Churchill Livingstone, Edinburgh 1979
- (52) MIYAKE, E., OHTA, M., MATSUSHIMA, T.:
A Human Glial Cell Line Synthesizing Nervous Tissue-Specific (S100) Protein.
Gann. 69: 737-738, 1978
- (53) MOLIN, S.-O., ROSENGREN, L., HAGLID, K., BAUDIER, J.,
HAMBERGER, A.:
Differential Localization of "Brain-specific" S-100 and
its Subunits in Rat Salivary Glands.
J. Histochem. Cytochem. 32: 805-814, 1984
- (54) MOORE, B.W.:
Chemistry and Biology of the S-100 Protein.
Scand. J. Immunol. 15, Suppl. 9: 53-74, 1982
- (55) MÜLLER, W., SCHRÖDER, R.:
Zur Diagnostik der Gliome.
Neurochirurgia (Stuttg.) 11: 30-36, 1968
- (56) NAKAJIMA, T., WATANABE, S., SATO, Y., KAMEYA, T.,
SHIMOSATO, Y.:
Immunohistochemical Demonstration of S100 Protein in
Human Malignant Melanoma and Pigmented Nevi.
Gann. 72: 335-336, 1981

- (57) NIESSING, K., SCHARRER, E., SCHARRER, B., OKSCHE, A.:
Die Neuroglia: Historischer Überblick.
In: Handbuch der Anatomie, Auflage, Bd. IV/10:
Neuroglia I.Hrsg. A. Oksche.
Springer-Verlag, Heidelberg 1980
- (58) OSBORN, M., WEBER, K.:
Biology of Disease: Tumor Diagnosis by Intermediate
Filament Typing: A Novel Tool for Surgical Pathology.
Lab. Invest. 48: 372-394, 1983
- (59) OSTERTAG, B.:
Pathologie der raumfordernden Prozesse des Schädel-
innenraumes.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1941
- (60) PEIFFER, J.:
Neuropathologie.
In: Pathologie, Band 4. Hrsg. W. Remmele.
Springer-Verlag, Heidelberg 1984
- (61) PENFIELD, W.:
Neuroglia: Normal and Pathological.
In: Cytology & Cellular Pathology of the Nervous
System, Band 2, Kap. IX. Hrsg. W. Penfield.
Hafner Publishing Company, New York 1965
- (62) PILKINGTON, G.F., LANTOS, P.L., DARLING, J.L., THOMAS,
D.G.T.:
Three Cell Lines from a Spontaneous Murine Astrocytoma
Show Variation in Astrocytic Differentiation.
Neurosc. Lett. 34: 315-320, 1982

- (63) PONTEN, J., MACINTYRE, E.H.:
Long Term Culture of Normal and Neoplastic Human Glia.
Acta path. microbiol. scandinav. 74: 465-486, 1968
- (64) POSTE, G., GREIG, R.:
The Experimental and Clinical Implications of Cellular
Heterogeneity in Malignant Tumors.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 106: 159-170, 1983
- (65) RAJU, T.R., BIGNAMI, A., DAHL, D.:
Glial Fibrillary Acidic Protein in Monolayer Cultures
of C-6 Glioma Cells: Effect of Aging and Dibutryl
Cyclic AMP.
Brain Res. 200: 225-230, 1980
- (66) ROHOLL, P.J.M., DE JONG, A.S.H., RAMAEKERS, F.C.S.:
Application of Markers in the Diagnosis of Soft Tissue
Tumours.
Histopathology 9: 1019-1035, 1985
- (67) RUBINSTEIN, L.J.:
Tumors of the Central Nervous System.
In: Atlas of Tumor Pathology, Band 6, 2. Serie.
Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C.
1972
- (68) RUBINSTEIN, L.J.:
Diagnostic Applicability of GFA Protein Immuno-
peroxidase Staining.
In: Atlas of Tumor Pathology, Suppl. Tumors of the
Central Nervous System, Band 6, 2. Serie, S. 21.
Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C.
1982

- (69) SCHIFFER, D., GIORDANA, M.T., GERMANO, J., MAURO, A.:
Anaplasia and Heterogeneity of GFAP Expression in
Gliomas.
Tumori 72: 163-170, 1986
- (70) SCHIFFER, D., GIORDANA, M.T., MAURO, A., MIGHELI, A.:
Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) in Human
Cerebral Tumors. An Immunohistochemical Study.
Tumori 69: 95-104, 1983
- (71) SCHUBERT, D.:
Developmental Biology of Cultured Nerve, Muscle, and
Glia. Kap. 3 und 4.
John Wiley & Sons, New York 1984
- (72) STAVROU, D., HAGLID, K.G., RÖNNBÄCK, L.:
The S-100 Protein in Rat Brain and in Methylnitrosourea
-Induced Tumors of the Rat Nervous System.
Europ. Neurol. 10: 168-178, 1973
- (73) STERNBERGER, L.A., HARDY, P.H.Jr., CUCULIS, J.J.,
MEYER, H.G.:
The Unlabelled Antibody-Enzyme Method of Immunohisto-
chemistry. Preparation and Properties of Soluble
Antigen-Antibody Complex (Horseradish Peroxidase-
Antihorseradish Peroxidase) and its Use in the
Identification of Spirochetes.
J. Histochem. Cytochem. 18: 315-333, 1970
- (74) STOCHDORPH, O.:
Klassifikation der Hirngeschwülste.
In: Computertomographie intrakranieller Tumoren aus
klinischer Sicht. Hrsg. E. Kazner, S. Wende,
Th. Grumme, W. Lanksch, O. Stochdorph.
Springer-Verlag, Heidelberg 1981

- (75) TAKAHASHI, K., ISOBE, T., OHTSUKI, Y., AKAGI, T.,
SONOBE, H., OKUYAMA, T.:
Immunohistochemical Study on the Distribution of Alpha
and Beta Subunits of S-100 Protein in Human Neoplasm
and Normal Tissues.
Virchows Arch. (Cell. Pathol.) 45: 385-396, 1984
- (76) TEMPLE, S., RAFF, M.C.:
Differentiation of a Bipotential Glial Progenitor Cell
in Single Cell Microculture.
Nature (Lond.) 313: 223-225, 1985
- (77) DE TRIBOLET, N., CARREL, S.:
Human Glioma Tumour-associated Antigens.
Cancer Immunol. Immunother. 9: 207-211, 1980
- (78) TRIMMER, P.A., REIER, P.J., OH, T.H., ENG, L.F.:
An Ultrastructural and Immunocytochemical Study of
Astrocytic Differentiation In Vitro.
J. Neuroimmunol. 2: 235-260, 1982
- (79) ULRICH, J., KASPER, M., JANCER, H., BASLER, V.,
HEITZ, PH.U.:
Glial Proteins in Myelinating Tissue Cultures
Visualized by Postembedding Immunocytochemistry.
Brain Res. 240: 199-202, 1982
- (80) VANDESANDE, F.:
Peroxidase-Antiperoxidase Techniques.
In: Immunohistochemistry, Kap. 4. Hrsg. A.C. Cuello.
John Wiley & Sons, New York 1983

- (81) VELASCO, M.E., DAHL, D., ROESSMANN, U., GAMBETTI, P.:
Immunohistochemical Localization of Glial Fibrillary
Acidic Protein in Human Glial Neoplasms.
Cancer 45: 484-494, 1980
- (82) ZÜLCH, K.J.:
Histological Typing of Tumours of the Central Nervous
System.
World Health Organization, Genf 1979
- (83) ZÜLCH, K.J.:
Biologie und Pathologie der Hirngeschwülste -
Astrocytome.
In: Handbuch der Neurochirurgie, 3. Band: Pathologische
Anatomie der raumbeengenden intrakraniellen Prozesse.
Hrsg. H. Olivecrona, W. Tönnis.
Springer-Verlag, Heidelberg 1956

Tabelle 1: Auflistung der 143 Einzelbeobachtungen mit Angabe der am Tumoraufbau beteiligten Zellformen und deren Reaktionsverhalten bei Nachweis glia-assoziiierter Antigene.

(Erläuterungen am Tabellenende)

Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung							Zellkultur
					fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten -ähnlich	undifferenziert	
1	w	43	li.-temp.	A II								
			GFAP		++							
			S-100 lokal		+							
			diffus		-							
2	w	46	li.-temp.	A II								
			GFAP		+++	+	++					
			S-100 lokal			+						
			diffus			-						
3	w	47	li.-temp.	A II								
			GFAP		++					+	+	
			S-100 lokal		-					-	-	
			diffus		-							
4	m	35	re.-temp.-par.	A II								
			GFAP		+++		+++			+		
			S-100 lokal		++		++			-		
			diffus		-		-					
5	m	35	Balken	A II								
			GFAP		+							
			S-100 lokal		+							
			diffus		-							
6	m	52	re.-par.	A II								
			GFAP		+++		+					
			S-100 lokal		+++							
			diffus		-							
7	m	36	re.-front.	A II								
			GFAP				+					
			S-100 lokal				+					
			diffus				-					

Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung							Zellkultur
					fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten-ähnlich	undifferenziert	
8	m	46	li.-praezentr.	A II								
			GFAP		+++							
			S-100 lokal		+++							
			diffus		+							
9	m	2	Hirnstamm	A II								
			GFAP		+++							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							
10	m	41	li.-front.	A II								
			GFAP		++							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							
11	w	35	li.-temp.	A II								
			GFAP		-							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							
12	m	59	re.-temp.	A II								
			GFAP		-							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							
13	m	47	re.-temp.	A II								
			GFAP		+							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							
14	w	30	re.-par.-occ.	A II								
			GFAP		++	++					+	
			S-100 lokal		+	++					-	
			diffus		-	-						
15	w	37	re.-temp.-par.	A II								
			GFAP		-	+						
			S-100 lokal		-	+						
			diffus		-	-						
16	w	37	re.-par.-temp.	A II								
			GFAP		-							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							

Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung							Zellkultur
					fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten-ähnlich	undifferenziert	
17	m	42	re.-temp.	A II								
			GFAP		++		++					
			S-100 lokal		-		+					
			diffus		-		-					
18	m	42	re.-temp.	A II								
			GFAP		-	+						
			S-100 lokal		-	-						
			diffus		-	-						
19	w	73	re.-temp.	A II								
			GFAP		+							+
			S-100 lokal		+							(+)
			diffus		+							
20	w	46	li.-front.	A II								
			GFAP		+	+			+		+	+
			S-100 lokal		-	-			-		-	++
			diffus		-							
21	m	38	re.-subcort.	A II								
			GFAP		-							+
			S-100 lokal		-							(+)
			diffus		-							
22	m	29	re.-praezentr.	A II								
			GFAP		++							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							
23	m	51	li.-temp.	A II								
			GFAP		++	++	++					
			S-100 lokal		+	+						
			diffus		-	-						
24	m	40	re.-front.-temp.	O-A II								
			GFAP		+						-	
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							

Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung						Zellkultur
					fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten -ähnlich	undifferenziert
8	m	46	li.-präzent.	A II							
			GFAP		++						
			S-100 lokal		++						
			diffus		+						
9	m	2	Hirnstamm	A II							
			GFAP		+++						
			S-100 lokal		-						
			diffus		-						
10	m	41	li.-front.	A II							
			GFAP		++						
			S-100 lokal		-						
			diffus		-						
11	w	35	li.-temp.	A II							
			GFAP		-						
			S-100 lokal		-						
			diffus		-						
12	m	59	re.-temp.	A II							
			GFAP		-						
			S-100 lokal		-						
			diffus		-						
13	m	47	re.-temp.	A II							
			GFAP		+						
			S-100 lokal		-						
			diffus		-						
14	w	30	re.-par.-occ.	A II							
			GFAP		++	++				+	
			S-100 lokal		+	++				-	
			diffus		-	-					
15	w	37	re.-temp.-par.	A II							
			GFAP		-	+					
			S-100 lokal		-	+					
			diffus		-	-					
16	w	37	re.-par.-temp.	A II							
			GFAP		-						
			S-100 lokal		-						
			diffus		-						

Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung							Zellkultur
					fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten -ähnlich	undifferenziert	
17	m	42	re.-temp.	A II								
			GFAP		++		++					
			S-100 lokal		-		+					
			diffus		-		-					
18	m	42	re.-temp.	A II								
			GFAP		-	+						
			S-100 lokal		-	-						
			diffus		-	-						
19	w	73	re.-temp.	A II								
			GFAP		+							+
			S-100 lokal		+							(+)
			diffus		+							
20	w	46	li.-front.	A II								
			GFAP		+	+			+		+	+
			S-100 lokal		-	-			-		-	++
			diffus		-							
21	m	38	re.-subcort.	A II								
			GFAP		-							+
			S-100 lokal		-							(+)
			diffus		-							
22	m	29	re.-praezentr.	A II								
			GFAP		++							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							
23	m	51	li.-temp.	A II								
			GFAP		++	++	++					
			S-100 lokal		+	+						
			diffus		-	-						
24	m	40	re.-front.- temp.	O-A II								
			GFAP		+							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							

Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung						Zellkultur
					fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten-ähnlich	undifferenziert
25	m	45	li.-front.-paramedian	O-A II							
			GFAP		++					-	
			S-100 lokal		-						
			diffus		-						
26	m	42	re.-front.-temp.-par.	O-A II							
			GFAP		+					-	
			S-100 lokal		+						
			diffus		(+)						
27	m	57	li.-temp.	O-A II							
			GFAP		+					(+)	
			S-100 lokal		-					-	
			diffus		-						
28	w	29	li.-occ.	O-A II							
			GFAP		+					(+)	
			S-100 lokal		-					-	
			diffus		-						
29	m	48	re.-zentr.	O-A II							
			GFAP		+++	+++	+++			++	
			S-100 lokal		-	-	-			-	
			diffus		-						
30	m	49	re.-temp.-par.-occ.	O-A II							
			GFAP		+					(+)	
			S-100 lokal		+					-	
			diffus		-						
31	w	29	re.-temp.-occ.	O-A II							
			GFAP		+					-	
			S-100 lokal		-						
			diffus		-						
32	m	36	re.-front.-praezentr.	O-A II							
			GFAP		+					+	
			S-100 lokal		-					-	
			diffus		-						

Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung							Zellkultur
					fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten-ähnlich	undifferenziert	
33	w	33	li.-front.- praezentr.	O-A II								
			GFAP		+							
			S-100 lokal		-						-	
			diffus		-							
34	w	60	re.-front.	O-A II								
			GFAP		+		+				-	
			S-100 lokal		-		-					
			diffus		-							
35	w	27	re.-temp.-par.	A III								
			GFAP		+++	+						
			S-100 lokal		-	-						
			diffus		-							
36	m	43	li.-front.	A III								
			GFAP		++					(+)		
			S-100 lokal		+					(+)		
			diffus		-					-		
37	w	54	re.-front.	A III								
			GFAP						-			
			S-100 lokal						-			
			diffus						-			
38	w	35	li.-par.	A III								
			GFAP		+							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							
39	m	59	re.-par.-temp.	A III								
			GFAP		++		++					
			S-100 lokal		++		++					
			diffus		+		+					
40	w	69	re.-par.-occ.	A III								
			GFAP		++			+			(+)	
			S-100 lokal		+			-			-	
			diffus		+							
41	w	33	re.-par.-occ.	A III								
			GFAP		+		+++					
			S-100 lokal		++		+++					
			diffus		-		-					

Nr.	Geschlecht Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung							Zellkultur
				fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten-ähnlich	undifferenziert	
42	w 34	li.-front.	A III								
		GFAP		++		+++					
		S-100 lokal		+		-					
		diffus		-							
43	w 48	re.-temp.	A III								
		GFAP		-							
		S-100 lokal		-							
		diffus		-							
44	w 48	re.-temp.	A III								
		GFAP		-							
		S-100 lokal		-							
		diffus		-							
45	w 54		A III								
		GFAP		-							
		S-100 lokal		-							
		diffus		-							
46	m 47	li.-intra- ventrikulär	A III								
		GFAP		-							
		S-100 lokal		-							
		diffus		-							
47	w 29	li.-temp.	A III								
		GFAP		++		+++					+
		S-100 lokal		+		+					-
		diffus		-		-					
48	w 29	li.-temp.	A III								
		GFAP		+		+++					++
		S-100 lokal		+		++					++
		diffus		-		-					-
49	w 61	re.-front.	A III								
		GFAP		+++		++		++		+	
		S-100 lokal		++		+		-		-	
		diffus		-		-					
50	w 61	re.-front.	A III								
		GFAP		+++		+	+				++
		S-100 lokal		++		+	-				+
		diffus		-		-					-

Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung							Zellkultur
					fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten-ähnlich	undifferenziert	
51	w	72	li.-front.- praezent.	A III								
			GFAP		++		++				+	
			S-100 lokal		-		-				-	
			diffus		-							
52	w	67	li.-par.-occ.	A III								
			GFAP				+		++			
			S-100 lokal				+		+			
			diffus				-		-			
53	m	32	li.-par.	A III								
			GFAP		++		++				+	
			S-100 lokal		+		+				-	
			diffus		-		-					
54	w	61	li.-front.	A III								
			GFAP		+	+						
			S-100 lokal		+	+						
			diffus		-	-						
55	w	71	li.-front.	A III								
			GFAP		+		++					
			S-100 lokal		-		-					
			diffus		-		-					
56	w	62	re.-front.-par.	A III								
			GFAP		-							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							
57	m	48	li.-front.- praezent.	A III								
			GFAP		++		+					
			S-100 lokal		+		-					
			diffus		-							
58	m	33	li.-par.- parasagittal	A III								
			GFAP		++							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							

Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung							Zellkultur
					fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten-ähnlich	undifferenziert	
59	m	68	li.-temp.	A III								
			GFAP		++		+++					
			S-100 lokal		+		-					
			diffus		-							
60	m	54	re.-temp.-occ.	A III								
			GFAP		++		+					+
			S-100 lokal		+		+					-
			diffus		+		-					
61	w	71	re.-par.	A III								
			GFAP		+++	++	++					+
			S-100 lokal		++	+	+					+
			diffus		-	-	-					-
62	m	69	li.-temp.-occ.	A III								
			GFAP		+							
			S-100 lokal		+							
			diffus		+							
63	m	54	li.-occ.	A III								
			GFAP		++							+
			S-100 lokal		-							-
			diffus		-							
64	m	71	re.-occ.	A III								
			GFAP				++					(+)
			S-100 lokal				(+)					-
			diffus				-					
65	w	62	re.-par.-occ.	A III								
			GFAP		+							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							
66	w	66	li.-par.-occ.	A III								
			GFAP		-							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							
67	m	71	re.-occ.	A III								
			GFAP		+++							+
			S-100 lokal		++							-
			diffus		-							

Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung							Zellkultur
					fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten-ähnlich	undifferenziert	
77	m	47	re.-front.	A III								
			GFAP		++		+			+		++
			S-100 lokal		+							+
			diffus		(+)		-					
78	m	48	li.-praezentr.	A III								
			GFAP		+	(+)						
			S-100 lokal		-	-						
			diffus		-							
79	m	60	li.-front.	A III								
			GFAP		++	(+)						
			S-100 lokal		-	-						
			diffus		-							
80	m	54	re.-temp.-occ.	A III								
			GFAP		++		+					
			S-100 lokal		-		+					
			diffus		-							
81	m	54	li.-par.-occ.	A III								
			GFAP		+	+	+	+	+		+	
			S-100 lokal		-	-	-	-	-		-	
			diffus		-							
82	w	32	li.-praezentr.	A III								
			GFAP		+		+++					
			S-100 lokal		-		+					
			diffus		-		-					
83	m	70	re. Falx tent.	A III								
			GFAP		++	+				(+)		
			S-100 lokal		+	-				-		
			diffus		-							
84	m	33	unterer Balken	A III								
			GFAP		+				+			+
			S-100 lokal		(+)				-			+
			diffus		+							
85	w	60	re.-temp.	A III								
			GFAP		+++							
			S-100 lokal		++							
			diffus		+							

Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung							Zellkultur
					fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten -ähnlich	undifferenziert	
86	w	14	li.-temp.	A III								
			GFAP		-							
			S-100 lokal		+							
			diffus		-							
87	m	75	re.-par.-occ.	A III								
			GFAP		++		+++					
			S-100 lokal		+		(+)					
			diffus		++		-					
88	w	55	li.-praezent.	A III								
			GFAP		+	(+)				+		+
			S-100 lokal		+	+				(+)		+
			diffus		+	-				-		
89	m	54	li.-par.-occ.	A III								
			GFAP			+	++			+		+
			S-100 lokal			-	+			-		-
			diffus				-					
90	w	60	li.-par.-occ.	A III								
			GFAP									
			S-100 lokal									
			diffus									
91	m	56	li.-front.	A III								
			GFAP		+		+			(+)		
			S-100 lokal		+		-			-		
			diffus		(+)							
92	m	48	li.-temp.-occ.	G								
			GFAP		+						(+)	
			S-100 lokal		+						-	
			diffus		-							
93	w	64	re.-front.- praezent.	G								
			GFAP					+			++	
			S-100 lokal					+			-	
			diffus					-				
94	w	74	re.-par.	G								
			GFAP				++					
			S-100 lokal				-					
			diffus				-					

Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung						Zellkultur	
					fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten-ähnlich		undifferenziert
95	m	40	li.-front.-par.	G								
			GFAP									+
			S-100 lokal									-
			diffus									-
96	w	60	re.-front.	G								
			GFAP		++	+	++		(+)			+
			S-100 lokal		-	-	-		-			+
			diffus		-							-
97	m	11	li.-temp.	G								
			GFAP									+
			S-100 lokal									-
			diffus									-
98	m	47	re.-front.	G								
			GFAP		++		+		++			++
			S-100 lokal		++		+		+			++
			diffus		-		-		-			-
99	w	38	li.-front.-par.	g G								
			GFAP		-							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							
100	w	39	li.-par.	g G								
			GFAP		++				++	+		+
			S-100 lokal		+				+	+		-
			diffus		-				-	-		
101	w	42		G								
			GFAP		+						(+)	
			S-100 lokal		+							-
			diffus		++							
102	w	65	li.-front.-praezentr.	G								
			GFAP		++		+					++
			S-100 lokal		-		-					-
			diffus		-							

Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung							Zellkultur
					fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten-ähnlich	undifferenziert	
103	m	33	li.-temp.	G								
			GFAP		++		++					+
			S-100 lokal		-		-					-
			diffus		+		-					
104	w	52	re.-par.	G								
			GFAP		+++			++		+		+
			S-100 lokal		+			-		-		-
			diffus		++							
105	m	66	re.-front.	G								
			GFAP		+				+		(+)	
			S-100 lokal		+				-			-
			diffus		++							
106	m	42	re.-par.- praezentri.	G								
			GFAP		++			(+)			(+)	
			S-100 lokal		-			-				-
			diffus		-							
107	w	69	li.-front.	G								
			GFAP		++	++	+			(+)	(+)	
			S-100 lokal		+	+	-			-		-
			diffus		++	-						
108	w	42		G								
			GFAP		+						(+)	
			S-100 lokal		+							-
			diffus		+							
109	m	44	li.-temp.	G								
			GFAP		++		+					
			S-100 lokal		+		-					
			diffus		++							
110	m	61	re.-temp.-par.	G								
			GFAP		+							
			S-100 lokal		+							
			diffus		(+)							
111	w	61	re.-temp.	G								
			GFAP		++		+		+	+		
			S-100 lokal		+		-		-	-		
			diffus		+							

Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung						Zellkultur	
					fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten-ähnlich		undifferenziert
112	w	55	re.-temp.	G								
			GFAP		-							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							
113	m	76	li.-temp.	G								
			GFAP		(+)					(+)	(+)	
			S-100 lokal		-					-	-	
			diffus		-							
114	w	63	li.-occ.	g G								
			GFAP		++		+		++			
			S-100 lokal		+		+		-			
			diffus		++		-					
115	w	44	re.-front.	G								
			GFAP		(+)						+	
			S-100 lokal		-						-	
			diffus		-							
116	m	52		G								
			GFAP		+						++	
			S-100 lokal		-						-	
			diffus		-							
117	m	72	re.-temp.-par.	G								
			GFAP		+						(+)	
			S-100 lokal		+						-	
			diffus		-							
118	m	31	HSG	g G								
			GFAP		-							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							
119	w	31	re.-temp.	G								
			GFAP		(+)							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							
120	w	31	re.-temp.	G								
			GFAP		+++				++		(+)	
			S-100 lokal		++				+		-	
			diffus		+				-			

Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung							Zellkultur
					fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten -ähnlich	undifferenziert	
121	m	55	re.-temp.-occ.	G								
			GFAP		++		+			+		
			S-100 lokal		-		-			-		
			diffus		-							
122	m	41	re.-front.-med.	G								
			GFAP		+							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							
123	m	68	li.-temp.	G								
			GFAP		+							
			S-100 lokal		-							
			diffus		-							
124	m	57	re.-front.-par.	G								
			GFAP		++		+			+		
			S-100 lokal		-		-			-		
			diffus		-							
125	w	73	li.-temp.-occ.	G								
			GFAP		+					+	+	
			S-100 lokal		-					-	-	
			diffus		-							
126	m	61	li.-occ.-par.	G								
			GFAP		+++		++			++		
			S-100 lokal		+		+			+		
			diffus		-		-			-		
127	w	51	li.-temp.-par.	G								
			GFAP		+	+				+	+	
			S-100 lokal		-	-				(+)	-	
			diffus		-					-		
128	m	48	re.-temp.-par.	G								
			GFAP		+					+	+	
			S-100 lokal		-					-	-	
			diffus		-							
129	w	63	re.-temp.	G								
			GFAP		+++		++			++		
			S-100 lokal		-		-			-		
			diffus		-							

Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung							Zellkultur
					fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten-ähnlich	undifferenziert	
130	w	71	re.-par.-occ.	G								
			GFAP		+++		++		++			
			S-100 lokal		-		-		-			
			diffus		-							
131	m	68	li.-temp.	G								
			GFAP		+++							+
			S-100 lokal		+							+
			diffus		++							-
132	m	61	li.-occ.	G								
			GFAP		+++		+		+			
			S-100 lokal		-		+		-			
			diffus		-		-					
133	w	63	re.-temp.	G								
			GFAP		++		++		++			
			S-100 lokal		+		+		-			
			diffus		-		-					
134	w	31	re.-temp.	G								
			GFAP		++							+
			S-100 lokal		++							-
			diffus		-							
135	m	54	li.-temp.-occ.	G								
			GFAP		+	++					(+)	++
			S-100 lokal		+	++					-	++
			diffus		+	-						
136	m	55	li.-par.	G								
			GFAP		++			+				++
			S-100 lokal		+			-				+
			diffus		+							
137	w	40	re.-par.-parasagittal	G								
			GFAP		++		+					+
			S-100 lokal		-		-					-
			diffus		-							
138	w	59	re.-temp.-par.	G								
			GFAP		+++	+	++			+	+	-
			S-100 lokal		-	-	-			-	-	-
			diffus		-							

Nr.	Geschlecht Alter	Lokalisation	Diagnose	Zelldifferenzierung							Zellkultur
				fibrillär	protoplasmatisch	gemistocytisch	fusiform	gigantozellulär	oligodendrocyten-ähnlich	undifferenziert	
139	w 55	li.-praezentr.	G								
		GFAP		++	+	+	+			+	-
		S-100 lokal		+	-	+	-			-	-
		diffus		-							
140	w 62	re.-par.-front.	G								
		GFAP		++		+	+			+	
		S-100 lokal		+		+	-			-	
		diffus		+		-					
141	w 64	re.-temp.-occ.	G								
		GFAP		++		++	+			+	++
		S-100 lokal		+		+	-			-	(+)
		diffus		+		-					
142	m 61	li.-front.-temp.	G								
		GFAP		++	+	++				+	(+)
		S-100 lokal		+	-	+				(+)	+
		diffus		++		-				-	
143	w 57	li.-front.	G								
		GFAP		++	+						
		S-100 lokal		+	(+)						
		diffus		+	-						

Erläuterungen

- keine Reagibilität
- (+) schwache Reagibilität
- + vereinzelte, nicht regelmäßig verteilte Reaktionsstellen
- ++ zahlreiche, nicht regelmäßig verteilte Reaktionsstellen
- +++ viele, dicht und felderförmig gruppierte Reaktionsstellen, die bei geringer Vergrößerung (10 fach) das Blickfeld so gut wie vollständig ausfüllen

Diagnosen:

- A II Astrocytom WHO-Grad II
- O-A II gemischtes Oligo-Astrocytom WHO-Grad II
- A III Astrocytom WHO-Grad III
- G Glioblastom
- gG gigantozelluläres Glioblastom

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. D. Stavrou für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und kritische Beratung.

Herrn Prof. Dr. P. Mehraein, Institut für Neuropathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, und Herrn Chefarzt Dr. E. Keiditsch, Institut für Pathologie des Krankenhauses München-Bogenhausen, danke ich für die Überlassung des Beobachtungsgutes und die Möglichkeit, es in ihrem Hause bearbeiten zu können.

Den Damen der Histologiellaboratorien der beiden Institutionen verdanke ich die Anfertigung der von mir gefärbten Schnitte.

Die in die Untersuchung einbezogenen Kulturen wurden von Frau K. Staemmler angelegt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K. Bise für unermüdliche Hilfe bei der Einarbeitung in die Literatur und bei der Zusammenstellung des Beobachtungsgutes.

Frau Katja Staemmler und Herrn Thomas A. Link danke ich sehr herzlich für ihre tatkräftige und geduldige Unterstützung.

Lebenslauf

30.11.1956	Geboren in Düsseldorf als Tochter von Dr. Otto Stochdorph und Dr. Brigitte Stochdorph, geb. Rössler
April 1962	Änderung des Wohnsitzes nach Söcking bei Starnberg
Sept. 1963	Einschulung in die Volksschule Söcking
Nov. 1966	Änderung des Wohnsitzes nach Gauting
Sept. 1966	Übergang auf das Elsa-Brandström-Gymnasium München-Pasing
1976	Abitur
Okt. 1978 - Febr. 1979	Studium der Chemie an der Universität Innsbruck/Österreich
April 1979 - Febr. 1980	Studium der Biologie an der Universität Zürich/ Schweiz
Mai 1980 - Nov. 1984	Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
8.11.1984	Tierärztliche Prüfung
seit Nov. 1984	Bearbeitung eines Dissertationsthemas an der Abteilung für funktionelle Pathologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

